REVISTA ESPAÑOLA DE BIOLOGÍA

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/boletin-de-la-real-sociedad-espanola-de-historia-natural_1936-02-29_5_1-2

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE HISTORIA NATURAL

REVISTA ESPAÑOLA DE BIOLOGÍA

(Continuación del BOLETÍN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE BIOLOGÍA)

TOMO V

PUBLICADA BAJO LA DIRECCIÓN DE
P. DEL RÍO-HORTEGA
T. HERNANDO A. DE ZULUETA I. COSTERO

SECRETARIO DE REDACCIÓN:
J. M. ORTIZ-PICÓN

Rev. españ. Biol.

MADRID, 1936

S. Aguirre, impresor.—General Álvarez de Castro 40.—Teléfono 30366.

LA VITAMINA «C» EN LA TÉCNICA HISTOLÓGICA DEL SISTEMA NERVIOSO

POR

M. PRADOS Y SUCH

En la presente nota técnica nos limitaremos a llamar la atención sobre un nuevo reductor que creemos puede ser de gran utilidad en la técnica histológica e histopatológica.

Nos ha guiado la idea de que siendo la vitamina C o ácido ascórbico una substancia de un gran poder reductor y que en función de tal interviene en el fisiologismo celular, la reacción en presencia de las sales de plata corrientemente utilizadas en histología se acercaría mucho más a la realidad y, consecuentemente, las imágenes deberían ser más reales y la reacción más constante.

A este efecto hemos realizado una serie de ensayos en material previamente fijado y sin fijar, al que sometíamos primeramente a la impregnación argéntica y que posteriormente reducíamos con una solución de ácido ascórbico.

Los ensayos realizados hasta ahora han recaído sobre animales de laboratorio y hemos empleado preferentemente la impregnación en bloque, aunque también lo hemos aplicado al método de los cortes, si bien en esta nota nos limitaremos a indicar los resultados obtenidos siguiendo el primer proceder. Estos varían extraordinariamente según el material esté o no fijado y también con la clase del fijador. Cuando se emplea, siguiendo la técnica de CAJAL, la previa fijación en solución piridinada con el consecuente pase por el alcohol amoniacal, imprégnanse las neurofibrillas con una nitidez y belleza que prestan a la imagen una impresionante calidad de realidad, permitiendo discernir con precisión la delicada trama neurofibrilar y pudiendo perseguir hasta sus últimas ramificaciones el trayecto de las dendritas. Son especialmente las capas de las medianas y pequeñas pirámides de la corteza las más bellamente impregnadas.

Si empleamos la fórmula de fijación por hipnóticos de CAJAL y CASTRO, obtenemos una impregnación completa de la delicada trama consti-

tuída por las fibras nerviosas, y muy especialmente de la zona molecular del cerebelo, donde hemos observado las más bellas imágenes. Fibras trepadoras, cestas pericelulares, fibras musgosas, tíñense con desusada limpieza y perfección, permitiendo discernir las más delicadas arborizaciones y trayectos. Por último, si recurrimos a bloques introducidos directamente en la solución argéntica, nos sorprende la limpieza con que aparece teñido el aparato endocelular de Golgi. Con material previa-

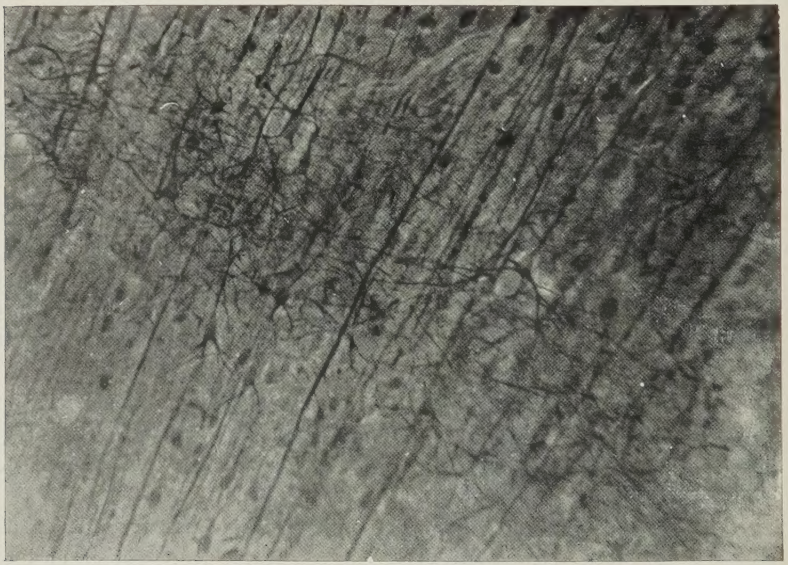


Fig. 1.—Corteza cerebral de rata. Fijación piridina.

mente fijado en el alcohol amoniacal, los resultados, aun no perfectamente limitados serán objeto de una comunicación ulterior.

Posteriores ensayos, ya más polarizados en el sentido de investigar la impregnación del aparato de Golgi, nos han llevado a obtener muy bellas imágenes de dicha estructura celular, simplemente con la impregnación del bloque en la solución argéntica, cosa que, por lo demás, ya fué entrevista por otros investigadores en estudios histoquímicos sobre la cápsula suparrenal y gonadas especialmente (Giroud). La posibilidad, pues, de obtener la reducción de la plata a nivel del aparato endocelular sin la necesidad de aplicar reductor alguno, hace muy verosímil la sospecha de que sea precisamente en esta estructura donde se localice una substancia

reductora que, en nuestro sentir, no podría ser otra que la propia vitamina C o ácido ascórbico, sobre todo si tenemos en cuenta los recientes trabajos de PLAUT y colaboradores, que han demostrado la riqueza en dicha vitamina del tejido nervioso y su presencia en el líquido cefalorraquídeo de los animales y del hombre.

A continuación exponemos el detalle de la marcha de la técnica según las estructuras que se desean poner de relieve.

Impregnación de las neurofibrillas.—1. Trozos frescos de cerebro y cerebelo de seis a ocho milímetros de espesor sumérgense por doce o

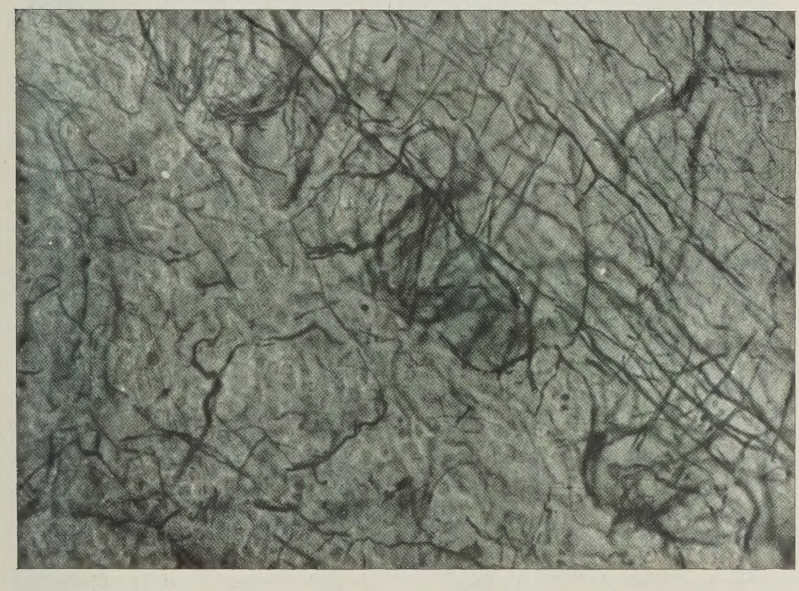


Fig. 2.—Cerebelo de gato adulto. Fijación en hidrato de cloral.

más horas en solución acuosa de piridina, y previo lavado prolongado en agua corriente, son sometidos a la acción del alcohol amoniacal como en el método de CAJAL clásico.

2. Previa eliminación del exceso de alcohol mediante secado de los bloques con papel de filtro, sumérgense en una solución de nitrato de plata al 1,5 por 100, donde permanecerán en frasco oscuro y en termostato a 37 grados durante cuatro a seis días.

3. Lavado rápido de los bloques en agua destilada para eliminar el exceso de la solución argéntica.

4. Inmersión de los bloques en una solución recientemente preparada de ácido ascórbico:

Acido ascórbico (vitamina C)	0,05
Agua destilada.....	100 c. c.

En esta solución permanecerán los bloques de dos a tres días en la estufa. Si el número de piezas es excesivo, la solución se enturbia, entur-

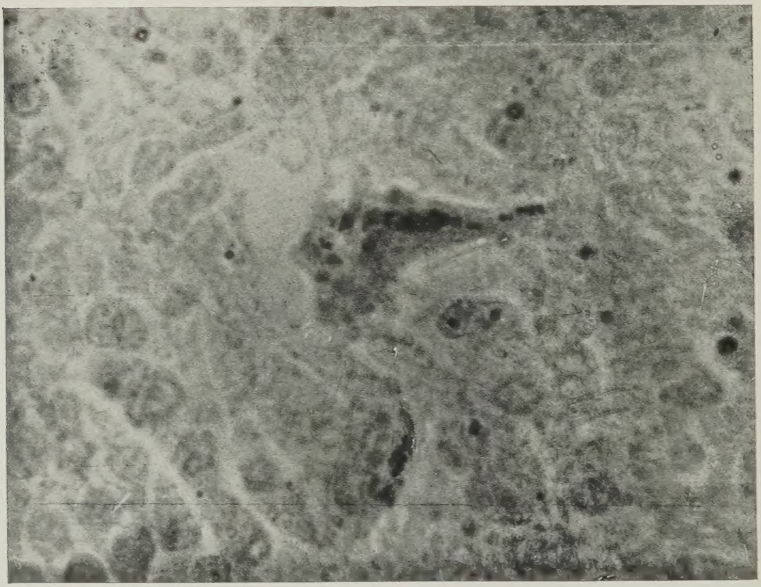


Fig. 3.—Célula de Purkinje del cerebelo de gato adulto. Material no fijado.

biamiento que suele ir aumentando. La presencia de este precipitado en nada parece que entorpece la limpieza de los preparados.

5. Lavado de los bloques en agua destilada.

6. Cortes por congelación o, mejor, inclusión en gelatina o celoidina.

7. Virado prolongado de los cortes hasta tono ligeramente purpúreo, en solución de oro al 1 por 600, en frío, y consecutivo fijado en solución de hiposulfito sódico.

8. Montaje.

Impregnación de las fibras nerviosas.—Tratamiento de los bloques, como en el método Cajal, con fijación en la solución alcohólica de hi-

drato de cloral y amoníaco. Impregnación en la solución argéntica exactamente lo mismo que en el proceder anterior, si bien la prolongación de dos o más días en la misma parece que presta a la reacción mayor belleza. Reducción en la solución vitamínica. Inclusión y montaje.

Impregnación del aparato de Golgi.—Se pueden lograr bellas impregnaciones de esta estructura con la inmersión de trozos frescos de tejido nervioso en la solución argéntica durante tres o cuatro días a 37 grados. Lavado en agua destilada, inclusión en gelatina. Virado en frío y fijado en hiposulfito sódico. El aparato de Golgi aparece limpiamente teñido sobre un fondo transparente. Se hace entonces necesario su consecuente coloración nuclear con el carmín alumínico, resaltando limpiamente la red endocelular, pudiéndose estudiar perfectamente sus relaciones con el núcleo de la célula.

Reiterados ensayos nos han hecho encontrar indudable ventaja acidificando levemente con ácido acético y utilizando una solución argéntica muy concentrada, a razón de XX gotas o menos por cada 100 centímetros cúbicos de la solución de plata al 10 por 100. La impregnación se hace más selectiva y limpia. El virado se hace siempre absolutamente necesario para lograr mayor intensidad en la coloración y limpieza del fondo, lo que contribuye a un más bello contraste. Es sobre todo a nivel de las células de Purkinje del cerebelo donde la reacción es más constante.

Como ya decimos, nuestros primeros ensayos fueron realizados con la consecutiva reducción con la solución vitamínica; pero, si bien siguiendo este proceder los resultados son casi idénticos, no creemos que se observe ventaja por lo menos en el cerebelo. Estudios que proseguimos en este momento nos inclinan a sospechar que acaso las diferencias de imagen que en ocasiones hemos observado entre preparados que habían o no sufrido la reducción por la solución vitamínica dependan de diversos estados funcionales del aparato de Golgi, toda vez que con la sola impregnación argéntica sólo son reducidos naturalmente aquellos elementos de la red que contienen la substancia reductora, mientras que la adición de la solución ascórbica lo reduce en su totalidad [1].

Como decimos, por último, también hemos utilizado la solución vitamínica en cortes de tejido nervioso previamente fijados; pero dejemos para una nota ulterior los detalles de la técnica que aun no tenemos suficientemente elaborada. Sólo mencionaremos el hecho de que en mate-

[1] Nuestros trabajos actuales, encaminados a la demostración histoquímica de la vitamina C en la célula nerviosa, sus relaciones con las diversas estructuras intracelulares, así como su distribución topográfica en el encéfalo, serán publicados en breve.

rial relativamente antiguo de formol-bromuro hemos obtenido muy bellas, aunque inconstantes, impregnaciones de la microglía en animales tan resistentes a su coloración como el gato.

Zusammenfassung.

Der Verfasser hat die reduzierenden Eigenschaften der Ascorbic Säure (Vitamin C) verwendet zur Reduktion der Silbersalze, die gewöhnlich in der histologischen Technik gebraucht werden. Die Ergebnisse sind verschieden je nach der Art des Fixierbades, in das die Gewebe vorher gelegt werden. Die Fixierung in Pyridin begünstigt die Imprägnierung der Neurofibrillen, das Chloralhydrat die Nervenfasern. Material, das nicht fixiert wurde, sondern direkt in die Silberlösung gelegt und später reduziert wurde, gewinnt die Imprägnierung des sogenannten Golgi-Apparates. In Übereinstimmung mit Giroud vermutet der Verfasser, dass es möglich sei, dass sich in dieser Gestaltung das Vitamin C physiologisch von dem Neuron lokalisiert.

Laboratorio de Neurología Experimental
del Instituto Cajal. Madrid.

EL DESARROLLO Y LA RELACIÓN NUMÉRICA ENTRE LOS SEXOS EN LOS HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS OBTENIDOS POR FECUNDACIÓN ARTIFICIAL EN EL GÉNERO *TRITON* (*MOLGE*)

POR

KÄTE PARISER

SUMARIO

Páginas.

Introducción 12
Planteamiento de la investigación 12
Material utilizado 13
Nomenclatura 14
Método:
1. *Fecundación artificial* 15
2. *Cría* 17
Combinaciones estudiadas 22
El desarrollo de los animales:
1. *Tanto por ciento* 25
2. *Duración* 35
3. *Caracteres híbridos* 38
4. *Tamaño de los animales metamorfoseados* 40
El desarrollo de las gonadas y la relación numérica entre los sexos. 45
El examen de seis híbridos cristatus ♀ × *taeniatus* ♂ *obtenidos por el Dr. Hamburger* 66
El examen de cinco híbridos taeniatus ♀ × *cristatus* ♂ *más de un año después de la metamorfosis* 66
Experimentos acerca de la madurez de los huevos:
1. *Supermadurez* 69
2. *Grados de madurez* 70
Conclusiones 71
Zusammenfassung 81
Bibliografía 88

INTRODUCCIÓN

En 1932 dí a conocer los resultados provisionales de mis experimentos: había obtenido 123 híbridos de *Triton taeniatus* ♀ × *cristatus* ♂, de los cuales sólo un ejemplar era del sexo masculino. En 1933 resumí los resultados del segundo año, en otros cruzamientos dentro del mismo género *Triton*. Después he completado mis trabajos hasta el verano último (1935). En lo fundamental los experimentos fueron realizados en el «Institut für Vererbungsforschung der Landwirtschaftlichen Hochschule» en Berlín-Dahlem, en el que, desde 1931, me fueron concedidas toda clase de facilidades para la realización de mis estudios. Desde 1933 he proseguido las investigaciones en el Laboratorio de Biología del Museo Nacional de Ciencias Naturales, de Madrid, gracias a la generosa acogida que me ha sido dispensada en este centro y por haber podido disfrutar, durante dos cursos, de la beca para extranjeras que el Ministerio de Estado sufraga anualmente a propuesta de la Asociación Universitaria Femenina. Constituye para mí un deber y una satisfacción el expresar mi profundo agradecimiento a aquella Asociación y a cuantos biólogos me han ayudado en estos trabajos con sus valiosos consejos, especialmente al Prof. Kappert y la Prof. P. Hertwig, de Dahlem, y a D. Ignacio Bolívar y D. Antonio de Zulueta, de Madrid, que ha tenido también la gentileza de revisar cuidadosamente este trabajo.

PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

He llegado al tema concreto de esta investigación al obtener, en otros experimentos, un resultado sorprendente: en un material heterogéneo de híbridos interespecíficos del género *Triton* Laur. (= *Molge* Merr., *Triturus* Raf.), obtenidos por fecundación artificial, observé, al tiempo de la metamorfosis, que la casi totalidad de los individuos eran hembras. La investigación me parecía tanto más tentadora cuanto que los numerosos autores que trabajan desde hace años con este mismo material (Bataillon, Hamburger, Poll, Spemann) apenas se habían dado cuenta de esta extraordinaria desproporción entre los sexos. Citaré la única noticia encontrada relativa a este asunto. Es de Lantz (1934) y se refiere al cruzamiento *Triton boscai* ♀ × *alpestris* ♂: «Obwohl dieselbe leicht gelingt, sind hier überhaupt noch keine Bastardmännchen erzielt worden...» Pensé que

de ello podía quizá surgir un punto de vista nuevo para los experimentos con tritones y sus cruzamientos.

Mis trabajos han tendido a resolver las cuestiones siguientes:

1) Si la combinación híbrida *taeniatus* ♀ × *cristatus* ♂ muestra efectivamente un predominio numérico del sexo femenino (1931).

2 *A*) Cómo se comportan las formas puras *taeniatus* ♀ × *taeniatus* ♂ y *cristatus* ♀ × *cristatus* ♂ en cuanto a la relación numérica entre los sexos:

a) en caso de fecundación natural,

b) en caso de fecundación artificial (1931-1932).

2 *B*) Qué relación guardan en cuanto al desarrollo, especialmente de las gonadas, al alcanzar la metamorfosis las especies puras en libertad y en cautividad, respecto a los híbridos (1931-1932).

3 *A*) Si todas las combinaciones híbridas de las cuatro especies que se encuentran en Alemania muestran la misma anomalía en la relación numérica entre los sexos (1932-1933).

3 *B*) Cómo se comportan en este respecto las combinaciones de algunas especies españolas (1934-1935).

4) Si la relación numérica entre los sexos es igual, cualitativa y cuantitativamente, en todas las combinaciones (1931-1933).

5) Si los híbridos muestran, en el curso de su desarrollo ulterior a la metamorfosis, la misma relación numérica entre los sexos que antes (1934).

6) Si de la pérdida de individuos producida hasta la metamorfosis se puede sacar alguna conclusión sobre la causa de la relación numérica anormal entre los sexos (1932-1933).

7) Si los caracteres histológicos de las gonadas autorizan alguna conclusión sobre la naturaleza de la relación numérica anormal entre los sexos (1931-1935).

MATERIAL UTILIZADO

Hemos utilizado en esta investigación las cuatro especies alemanas, *Triton taeniatus* [1], *T. cristatus*, *T. palmatus*, *T. alpestris*. En Madrid hemos hecho además algunos experimentos con *Triton marmoratus*,

[1] Apartándome de mis dos trabajos del año 1932 y 1933, llamo ahora al «kleiner Teichmolch» *taeniatus* y no *vulgaris*, a fin de uniformar mi nomenclatura con la de los autores que han trabajado experimentalmente en el género *Triton* (Spemann y su escuela).

T. boscai y *T. palmatus*, pero desgraciadamente, por causas que mencionaremos más adelante, los resultados con estas especies españolas han sido muy escasos para que puedan tomarse en cuenta en todas las cuestiones planteadas. Del material alemán los ejemplares de las especies *taeniatus* y *cristatus* procedieron de los alrededores de Berlín; los de las especies *palmatus* y *alpestris*, típicas de las montañas poco elevadas, me fueron enviados por ferrocarril desde Westfalia. Los animales soportan muy bien los viajes si se los acondiciona convenientemente en cajas de lata con musgo húmedo; los machos, aun después de algunas semanas, conservan la capacidad fecundante, pero para las hembras existen dos peligros: primero, el que depositen todos los huevos durante el transporte, y segundo, el que, después de cierto tiempo (algunas semanas), las gonadas sufren una degeneración grasa. Por otra parte, el hecho de que depositen algunos huevos en el musgo ofrece frecuentemente la ventaja de obtener así huevos fecundados de la especie pura. Además, si se han transportado separadamente los machos y las hembras, se tiene la seguridad de que los huevos aun no depositados están sin fecundar. (Insistiremos sobre este punto al tratar del «Método»).

Las especies españolas *boscai* y *marmoratus* viven en las cercanías de Madrid; *boscai* se encuentra también en las proximidades de Toledo y en el Guadarrama. La Granja (Segovia) proporciona muy buenos ejemplares de la especie *marmoratus*, de gran tamaño, vigorosos y de un color oscuro muy intenso (¿variación por temperatura?). Además he recibido numerosos ejemplares de *boscai* y *palmatus* de Asturias, favor que debo a las eficaces gestiones de mi colega D. Fernando Galán.

Los meses de abril y mayo son, en Berlín como en Madrid, los más favorables para la obtención de hembras capaces de desovar.

NOMENCLATURA

Desgraciadamente no existe uniformidad en los autores acerca de la nomenclatura de los híbridos. Bytinski-Salz (1933) señala las normas internacionales de la nomenclatura zoológica: en una combinación híbrida, «el nombre del macho debe preceder al de la hembra». Esta regla no se encuentra aplicada en muchísimos escritos de zoología genética y experimental, por ejemplo los de Bataillon, Federley, Goldschmidt y Spemann, para no nombrar más que los autores que se verán frecuentemente citados en este trabajo. También he incurrido yo en la misma falta en mis primeras publicaciones, pero creo que hoy sería aún más grave

apartarse de la terminología en ellas empleada. Además, en mis investigaciones se trata muchas veces de cruces recíprocos, por lo que un cambio de nomenclatura podría dar lugar a graves confusiones. Así, pues, también en adelante, mencionaré en primer término el progenitor femenino. Además, introduciré abreviaturas para simplificar los nombres de las especies de *Triton* que se repiten con tanta frecuencia; a saber: *taen* (= *taeniatus*), *palm* (= *palmatus*), *alp* (= *alpestris*), *crist* (= *cristatus*), *bosc* (= *boscai*) y *marm* (= *marmoratus*), y designaré las combinaciones puras e híbridas con nombres compuestos, por ejemplo: *taentaen* = la combinación pura *T. taeniatus; taenalp* = la combinación de *taeniatus* ♀ × *alpestris* ♂. Sólo en los cuadros y las láminas emplearé los nombres completos para facilitar la comprensión.

MÉTODO

1. *Fecundación artificial.*—Como se ve por el Catálogo de Wolterstorff (1925) se conocen entre los tritones muy pocos híbridos interespecíficos producidos a consecuencia de apareamiento, o sea de fecundación natural. Los más citados son los que proceden del cruce de las especies *crist* y *marm* en ambos sentidos; se encuentran en el sur de Francia, en la naturaleza, y se conocen con el nombre de «*Triton Blasii* de l'Isle». En cautividad se han logrado obtener por fecundación natural estas mismas combinaciones y hasta el cruce retrógrado *cristmarm* ♀ × *crist* ♂ (Lantz, 1934; Wolterstorff, 1903-1925), *marmcrist* ♀ × *crist* ♂ (Lantz, 1934) y *marmcrist* ♀ × *marm* ♂ (Lantz). También, de las especies ya mencionadas, se cruzaron *palm* y *taen* y se propagaron hasta la generación F_2 (Wolterstorff, 1925). Además se aparearon con éxito las especies *bosc* y *alp* (Schreitmüller, citado por Wolterstorff, 1925) y *taen* y *alp* (Schreitmüller). Si prescindimos de estas últimas, quedan sólo combinaciones de especies muy semejantes en su «habitus», como, por un lado, *crist* y *marm*, y por otro, *taen* y *palm*; pero las especies que, ya por el tamaño, se diferencian considerablemente, no se aparean, y sólo se pueden obtener híbridos por medio de la fecundación artificial.

Poll (1909) logró obtener por el «método de la fecundación seca», indicada por O. Hertwig en 1882, algunos híbridos de *taen* y *crist* en ambas direcciones. Este método lo ha empleado también con frecuencia la escuela de Spemann e igualmente Bataillon, para obtener éstas y otras combinaciones híbridas. Consiste en juntar los huevos, extraídos de una hembra matada *ad hoc*, con la esperma de un macho matado

también con este objeto. Se procede del modo siguiente [1]: se decapitan las hembras, cuyas cabezas por razones «humanitarias» se echan en alcohol de alta graduación para paralizar los centros nerviosos. Luego se abre el cuerpo desde la cloaca haste la garganta; debajo del intestino (que conviene cortar y desprender de la cloaca, llevándolo hacia adelante, para evitar que la substancia fecal ensucie los huevos), se encuentran, a ambos lados, los oviductos, que terminan dentro de la cavidad cloacal en la papila urogenital. En el caso más favorable hay unos diez huevos en cada oviducto [2]. Se cortan los oviductos y se llevan, con su contenido, a un vidrio de reloj, en el cual se reunen los de varias hembras, suficientes para reunir unos 50 a 80 huevos; la cantidad de éstos dependerá de la riqueza de las distintas hembras utilizadas, pues no hay que dejar que los oviductos y los huevos se sequen, por lo cual es preciso operar de prisa y pasar a la segunda fase de la operación, aun cuando, por insuficiencia ovular de las hembras, sea escasa la cantidad de huevos en el vidrio de reloj [3].

La segunda fase consiste en vaciar los oviductos, en lo posible, sin tocar los huevos, pues, a pesar de su gran plasticidad, éstos se rompen o alteran fácilmente por contacto. Es tanto más fácil separar el epitelio del oviducto cuanto más fresco y húmedo haya quedado éste; se recomienda, por ello, humedecer reiteradamente, con el aliento, los oviductos y los huevos extraídos. En el caso más favorable se puede pinchar el epitelio con dos agujas, henderlo con ellas a lo largo y entonces los huevos, salen al exterior sin haber sido tocados. Obtenidos así todos los huevos, se los coloca (siempre sobre el vidrio de reloj) en cámara húmeda.

A continuación se procede de análoga manera con un macho: se ex-

[1] En esta descripción me atengo al procedimiento que empleo, el cual difiere del original sólo en algún detalle insignificante.

[2] Es de suma importancia no utilizar los huevos que han pasado ya a la cavidad cloacal, pues positivamente a veces están fecundados, como lo demuestra una nota de mi registro de 1932, N.° 158: «de 32 huevos recogidos el 11 de mayo de 1932 de la cloaca [al deslizarse por la abertura cloacal], 4 resultaron capaces de desarrollo [se desarrollaron]». Tampoco es prudente utilizar el último huevo que quede en el oviducto, después de la puesta, cerca de la desembocadura en la cloaca, porque pudiera asimismo estar fecundado. Wolterstorff (1888) también habla de una «fecundación interna». En cambio se pueden emplear sin reservas los huevos que se encuentren en la parte más alta del oviducto (véase Born, 1892, en cuanto a la posibilidad de fecundar huevos «todavía no maduros»).

[3] Si hay especial interés en la identificación exacta de cada uno de los huevos, en lugar de recogerlos en un vidrio de reloj se les coloca en filas en un portaobjetos, situación que conservan por lo que luego se explicará.

traen los espermiductos [1] de ambos lados, en lo posible en toda su longitud, desprendiéndolos preferentemente desde la cloaca hacia la gonada, pues así quedaría en ellos mayor cantidad de esperma, en caso de que se rompiesen. Es prudente extraerlos también sin que lleven sangre adherida, porque, según se dice, tiene un efecto nocivo sobre la movilidad de los espermatozoides. Luego, en un vidrio de reloj, se cortan los espermiductos en pedacitos para que salga el líquido espermático, y tomando una gotita de éste se examina al microscopio la movilidad de los espermatozoides. Si el resultado es satisfactorio, se diluye el líquido espermático con una gota de solución fisiológica de cloruro sódico (al 0,7 por 100 aproximadamente; SPEMANN (1918) la emplea al 0,2 por 100). Esta dilución no es absolutamente imprescindible, pero se recomienda en los machos de las especies pequeñas, que no proporcionan líquido abundante. Con unas pinzas se cogen, luego, pedacitos del espermiducto triturado, mojados en el líquido, y usándolos a modo de pincel se hace una aureola lechosa alrededor de cada huevo. Luego se pone el vidrio de reloj en la cámara húmeda, dejándolo en reposo de veinte minutos a media hora para que el líquido espermático no se separe de los huevos antes de que el espermatozoide, o mejor dicho, *los espermatozoides*—ya que, según FANKHAUSER y SPEMANN, hay poliespermía fisiológica en el género *Triton*—hayan podido penetrar en el huevo. Después el vidrio de reloj, con su contenido, se sumerge en agua.

Para cada operación se deben hervir los instrumentos, portaobjetos y vidrios de reloj; lavar con alcohol absoluto las cubetas y esterilizar en autoclave los paños. Sólo así se tendrá la seguridad de que no han intervenido en la operación elementos extraños, que podrían falsear los resultados de la fecundación artificial.

2. *Cría.*—Sirven para la cría cualesquiera recipientes que tengan gran superficie en relación con su profundidad (boles, cristalizadores, etc.) para que el agua en ellos contenida presente mucha superficie de contacto con el aire; se puede prescindir de la aireación artificial si se la renueva al menos dos veces por semana (lo mejor es hacerlo días alternos). El agua no se debe tomar directamente del grifo, por dos razones: primeramente, para evitar grandes diferencias de temperatura; segundo, para evitar las burbujas de aire que siempre se encuentran suspendidas en el agua de la cañería y que, metiéndose entre las branquias larvales, perjudicarían su función, o penetrando en el estómago provocarían

[1] Los espermiductos de las especies pequeñas *(taen, palm* y *bosc),* durante la época del celo, se distinguen por su intensa coloración negruzca, mientras que los de *crist* y *marm* carecen de pigmento.

graves trastornos del equilibrio del cuerpo. Por otra parte, no hay que exponer los recipientes directamente al sol porque se calentarían excesivamente, tanto más cuanto que sólo contienen una pequeña cantidad de agua (de medio litro a tres cuartos de litro).

También la atmósfera parece influir sobre los resultados; he podido observar en distintos momentos y en dos diferentes localidades (Berlín y Madrid) que la atmósfera de museo es dañosa para el desarrollo de los «gérmenes» (nombre con que designamos los primeros estados del desarrollo embrionario hasta la néurula). No he podido dilucidar si esto se debe al polvo o si son los vapores de los productos utilizados para la conservación (naftalina, etc.) los que provocan la muerte de los gérmenes. De cualquier modo, en 1934 he experimentado que los gérmenes de híbridos—y hasta cantidades relativamente grandes de gérmenes testigos—murieron al criarlos en uno de los sótanos del Museo de Madrid, donde se conservaban con naftalina y jabón arsenical pieles de roedores, y que el traslado de los huevos, inmediatamente después de la fecundación artificial, a un local separado del Museo, bastó para proporcionar las condiciones indispensables para que continuara el desarrollo. Es, en cambio, extraño que para las larvas la atmósfera del Museo ya no resultó dañina.

Para ahorrar tiempo es recomendable dejar los huevos, hasta poco antes de la eclosión, en el vidrio de reloj, al que están fuertemente adheridos por su membrana exterior, la «Klebschicht» de Spemann (1901). Los huevos que no se desarrollan o que mueren después de iniciado el desarrollo se enmohecen, cubriéndose de saprolegniáceas. Pero no se recibe la impresión de que los huevos, al enmohecerse, puedan infectar a los sanos; más bien, los huevos se enmohecerían sólo después de la muerte del germen. Esta parece ser también la opinión de Wolterstorff (1903), quien considera el enmohecimiento «als äusseres Anzeichen, seltener als Ursache (?) des Verpilzens». Por eso me parece un error el bañar en una solución de permanganato potásico, con el propósito de salvarlos, los huevos que se encuentran al comienzo del proceso de enmohecimiento. De todos modos, es prudente separar, después de unos días, los huevos enmohecidos.

Cuando las larvas jóvenes salen del huevo, hacia los catorce días (véanse detalles más exactos en el «Desarrollo»), es conveniente introducir en el recipiente una planta acuática (*Elodea* sp. o *Myriophyllum* sp.) que ofrezca a las larvas un escondrijo y que asegure—y esto es lo fundamental—la renovación constante del oxígeno.

Se acostumbra iniciar la alimentación de las larvas jóvenes con infu-

sorios del heno; pero, en mi opinión, esto es completamente inútil, porque en las larvas recién salidas del huevo no está aún perforada la abertura bucal [véase la «Normentafel» de GLAESNER, según la cual la perforación de la abertura bucal no se produce hasta el segundo estado después de la eclosión (estado 37 y 39)]. Además, hasta este día, como se puede ver a simple vista, no ha sido consumido enteramente el vitelo; agotado éste, se percibe a través de las transparentes paredes del cuerpo el color pardusco de la substancia fecal en el intestino. En este estado, mientras en los miembros anteriores se van formando los dedos y comienzan a resorberse los balancines («Rusconische Haken»), es cuando las larvas empiezan a tomar alimento. Lo más conveniente es la alimentación con *Cyclops* o con *Daphnia* muy jóvenes, porque ambos crustáceos se conservan vivos mucho tiempo y, gracias a su animada movilidad, las larvas los perciben fácilmente. Pero la alimentación con *Cyclops* ofrece un gran peligro: si a las larvas jóvenes se les añade en el cristalizador una cantidad excesiva de *Cyclops*, éstos se comen a aquéllas y no a la inversa. En los primeros años de mis experimentos me ha ocurrido algunas veces que, en el deseo de proporcionar a las larvas alimento en abundancia para un día entero, introduje en el recipiente un gran número de *Cyclops*, viendo al día siguiente, con el natural disgusto, que aun de las más vigorosas larvitas híbridas, tan valiosas, quedaba sólo el esqueleto cartilaginoso. Es en realidad muy difícil el dosificar este alimento y aun más, expresar exactamente esta dosis: un práctico del Acuario de Berlín me indicó que habría que introducir de una vez solamente la cantidad de *Cyclops* que las larvas pudieran consumir en un cuarto de hora, añadiendo que, para que pudieran desarrollarse bien, las larvas debían estar siempre provistas de alimento. Es evidente que estas dos condiciones son difíciles de reunir cuando se trata de atender simultáneamente numerosos cultivos.

Por esto prefiero utilizar otro alimento: los *Enchytraeus* (anélidos oligoquetos). Las larvas, ya desde el primer día de su alimentación, toman *Enchytraeus* sumamente pequeños, que hay que proporcionarles cortados en trocitos. Esto ofrece sólo el inconveniente de que los *Enchytraeus*, al poco tiempo de estar en el agua, cesan de moverse y mueren. Hay que dar, pues, diariamente a las larvas alimento fresco, y al principio conviene dejar caer los trocitos de *Enchytraeus* directamente encima de la boca de la larva, porque sólo el movimiento es capaz de despertar su atención. Más adelante las larvas hambrientas se colocan perpendicularmente a la superficie del agua y atrapan el alimento apenas se sumerge éste, lo que muestra claramente que los

tritones, en el agua, buscan su alimento más bien encima de ellos mismos que en el fondo. Por otra parte, los *Enchytraeus* son fáciles de criar; siguiendo los consejos de personas expertas, he conseguido *Enchytraeus* en las cantidades deseadas, teniéndolos en mantillo (no muy húmedo, para evitar el desarrollo de ácaros) y alimentándolos con papilla espesa de avena en copos, hecha con agua. Banta (1921) ha indicado un método para la cría de *Daphnia*, pero no creo que sea más fácil que la de *Enchytraeus*. Sería preferible, desde luego, proporcionar a las larvas una alimentación mixta, de *Daphnia* y *Enchytraeus*, por ejemplo.

Cuando las larvas son mayores, desde el momento en que tienen desarrolladas las extremidades posteriores, es mejor mantenerlas separadas para que no se coman unas a otras; así, es también más fácil asegurar que el alimento se reparta por igual entre todas las larvas. No está, sin embargo, por demás advertir que, aun teniendo el mayor cuidado por evitarlo, cuando se cuidan a un tiempo unos 500 individuos, involuntariamente se prefiere, en cierto modo, los híbridos más raros de cultivos pequeños a los ejemplares de especies puras.

Pocas semanas antes de la metamorfosis los tritones son capaces de saltar fuera del agua, y como aun no pueden moverse en la tierra y su piel carece todavía de resistencia contra la evaporación, no tardan mucho en morir junto al recipiente, completamente desecados.

El momento más crítico de la cría de tritones es el de la metamorfosis. Existen dos peligros por falta de observación: el que los animales se ahoguen y el que se escapen. Cuando las branquias comienzan a resorberse y los animales pierden repentinamente el apetito, y al colocarlos en la palma de la mano ya no serpentean como peces, sino que se arrastran (para indicar sólo algunas de las señales más marcadas), entonces ha llegado el momento de verter casi toda el agua del cristalizador y dejarlo completamente tapado; lo mejor es colocar el cristalizador con cierta inclinación, de modo que en el sitio más bajo quede un poco de agua. En los primeros años de cría tuve a menudo la desdichada experiencia de que los tritones, durante el período de metamorfosis, se ahogaban al pasar nuevamente de lo seco al agua.

Para distinguir los cultivos he utilizado, siguiendo un método de R. Hertwig, diferentes combinaciones de cuentas de vidrio de varios colores, que tienen la ventaja, sobre los signos escritos, de que en los frecuentes cambios de recipiente pueden ser fácilmente traspasadas junto con las larvas. La figura 1 muestra un tipo de recipiente, que ha dado buenos resultados en mis experimentos, con las cuentas de vidrio que marcan el cultivo.

Para el examen histológico sólo han servido las gonadas de los tritones que acababan de metamorfosearse (en algunos casos, de los que vol-

Fig. 1.—Modelo de acuario utilizado para la cría de los tritones. (Fotografía.)

veremos a hablar, hemos sacrificado los animales antes de este momento). Antes de obtener las gonadas tomamos las medidas del animal y practi-

Fig. 2.—Gonadas vistas *in situ* para apreciar su relación con los cuerpos adiposos G. = gonada derecha; C. a. = cuerpo adiposo izquierdo (× 2. Fotografía).

camos la decapitación; luego abrimos el abdomen, extirpamos el aparato digestivo hasta la garganta y, después de hacerle una señal para su iden-

tificación—lo que no se practicó en el año 1931—fijamos el tronco, con los cuerpos adiposos, las gonadas y los riñones *in situ* (fig. 2) en el líquido de ZENKER durante veinticuatro horas. Después de la fijación se separan del tronco estos órganos, cogiéndolos junto con parte de la pared de cuerpo, a fin de garantizar con esto último la extracción completa de las gonadas. Coloreamos previamente *in toto* los preparados con eosina, y los colocamos en parafina de tal modo que puedan ser cortados por el lado de los cuerpos adiposos, en dirección frontal, en series de cortes de 10 μ de grueso. Luego teñimos estos cortes con safranina y verde luz.

Como era de mucha importancia para las investigaciones el examinar el mayor número posible de individuos, tuve que añadir a los animales sacrificados algunas de las larvas crecidas y de los animales muertos naturalmente, que, en parte, estaban ya en estado de maceración. En éstos los indicios de diferenciación sexual apreciables en la anatomía microscópica se reconocían sin dificultad en la mayoría de los casos, aunque no fuese posible hacer en ellos una investigación histológica muy fina.

COMBINACIONES ESTUDIADAS

De las diez y seis combinaciones posibles entre las cuatro especies alemanas he obtenido, por fecundación artificial, las trece siguientes:

1.	*taentaen*	2.	*palmpalm*
3.	*alpalp*	4.	*cristcrist*
5.	*taenpalm*	6.	*palmtaen*
7.	*taenalp*	8.	*alptaen*
9.	*palmalp*	10.	*alppalm*
11.	*taencrist*	12.	*palmcrist*
	13.	*alpcrist*	

es decir, las cuatro combinaciones puras y nueve combinaciones híbridas. Además, gracias a la amabilidad de D. ANTONIO DE ZULUETA, que me envió a Berlín ejemplares de *marm* ♂♂ y ♀♀, logré obtener algunos híbridos *taenmarm*. En España he podido ampliar mis estudios con las siguientes combinaciones (para lo cual hice venir de Alemania a Madrid ejemplares de *crist*):

1.	*marmmarm*	2.	*marmcrist*
3.	*boscmarm*	4.	*bosccrist*
	5.	*palmbosc*	

Faltan, pues, en las combinaciones alemanas las tres combinaciones híbridas en que *crist* intervendría como progenitor femenino. De estas tres, la combinación *cristtaen* ya ha sido obtenida por Poll y Hamburger, pero, según afirman ambos, con un tanto por ciento de desarrollo bajísimo. Citaré a Poll: «Von 200 Eiern beider Arten, die zu diesen Versuchen dienten, begann zwar ein beträchtlicher Teil die Entwicklung; die weitaus grösste Anzahl starb auf den Stadien der Furchung, Morula und Gastrula ab; nur wenige erreichten die Form der ausgebildeten Larve; nämlich ein Mischling von *Triton vulgaris* ♂ *und Triton cristatus* ♀ und sieben der umgekehrten Kreuzung». Según los datos exactos de Hamburger, de 956 huevos de *crist*, fecundados por esperma de *taen* o de *palm*, sólo se desarrollaron 393, de los cuales sólo 8 animales llegaron a la metamorfosis. Hamburger agrega: «Again the old experience is confirmed that it is very difficult to obtain offspring from fertilization of a large egg (*cristatus*) by a small sperm (*taeniatus* and *palmatus*)». También Bataillon hizo con éxito muchas veces experimentos con huevos de *crist* y *marm*, pero no da cifras exactas sobre el tanto por ciento de desarrollo.

Por mi parte, he hecho en 1932 unos pocos experimentos con huevos de *crist:* he intentado obtener artificialmente las combinaciones *cristcrist* y *cristtaen*. De un total de 416 huevos sólo se segmentaron dos de la combinación *cristtaen*, y éstos murieron en seguida. Pero lo asombroso es el escaso desarrollo de la combinación *cristcrist:* de 245 huevos no obtuve más que 36 gérmenes, de los cuales sólo 19 (es decir, la mitad aproximadamente) llegaron a la eclosión. Este número es bajísimo, no sólo en relación con el de huevos, sino también en vista de las combinaciones restantes, sobre las que trataremos detenidamente. Por desgracia, no he podido tener noticias de si otros autores, en sus experimentos, han utilizado como testigo la fecundación artificial dentro de esta misma especie. Resultados análogos a los de *crist* he obtenido con *marm*, cuyos huevos, por la falta de pigmentación y por su tamaño, son muy parecidos a los de *crist*. Ya hemos visto, en efecto, que estas dos especies se cruzan naturalmente, dando una combinación híbrida *cristmarm* llamada «*Triton Blasii* de l'Isle». Además, Bataillon y Tchou Su (1930) han conseguido con frecuencia la combinación recíproca por fecundación artificial («une treintaine d'hybrides»), pero aunque señalan expresamente la facilidad del cruzamiento artificial y que pudieron fecundar con resultado positivo huevos de *marm* con esperma de otras especies, no se desprende, sin embargo, de sus trabajos, como hemos dicho, el tanto por ciento de gérmenes desarrollados, ni, sobre todo, si este tanto por ciento varía y en qué medida en las distintas combinaciones; tampoco es una casualidad el que, en

sus experimentos y con su práctica, sea una combinación en la que entra *crist* como hembra (la combinación *cristpalm*) la que haya fracasado (Bataillon y Tchou Su, 1932). En todo caso, he llegado a la convicción de que son los huevos grandes y sin pigmento los que ofrecen resistencia a la fecundación artificial, ya se trate de combinaciones dentro de la misma especie o de combinaciones híbridas. La causa de esta resistencia nos es desconocida. Quizá a la misma causa se debe atribuir la experien-

a b c

Fig. 3.—Tres larvas crecidas de la misma edad, poco antes de la metamorfosis: a), *taeniatus* ♀ × *taeniatus* ♂; b), *taeniatus* ♀ × *cristatus* ♂; c), *cristatus* ♀ × *cristatus* ♂. (Tamaño natural; fotografía.)

cia de O. Hertwig (1893) de que los huevos de *crist* son más sensibles que los de *taen* a las acciones traumáticas.

Esto se desprende también de los estudios de cruzamiento de G. y P. Hertwig (1914) en teleósteos (*Gobius*) en los que, cuando hay diferencia notable de tamaño entre los huevos de las especies, los voluminosos se prestan mucho menos a la hibridación que los pequeños de la combinación recíproca.

Digamos algunas palabras sobre el aspecto exterior y la coloración de los híbridos. No entraba en mis propósitos el hacer en este trabajo el estudio morfológico de los híbridos; importaba más bien poder diferenciar el híbrido con la máxima seguridad, sobre todo de la especie materna, a fin de tener la confirmación de que el individuo en cuestión era efectivamente híbrido y no un individuo puro que pudiera haberse

originado por la introducción involuntaria, con la planta acuática, de huevos fecundados naturalmente; también podría tratarse de individuos haploides, en los cuales la esperma habría dado el impulso para el desarrollo partenogenético del huevo sin participar en la formación del germen (P. Hertwig, 1920).

Basta, pues, para nuestros fines la comprobación del hibridismo por la observación de elementos evidentemente paternos en la coloración de la piel, lo que sucede en todos los casos, excepto en las combinaciones recíprocas de *palm* y *taen*. En cuanto al tamaño, es casi siempre intermedio entre ambas especies (insistiremos sobre esto, con más detalles, páginas 40-44). La figura 3 muestra el aspecto de tres ejemplares de la misma edad, de *taen*, *crist* y *taencrist*, los tres poco antes de la metamorfosis. El híbrido tiene coloración oscura con manchas y es de tamaño casi exactamente intermedio entre las especies progenitoras. Las figuras 4-16 muestran representantes de todos los cruces logrados; se ve inmediatamente que en la coloración de todos ellos existen elementos de origen paterno. Como ya hemos dicho, las combinaciones de *palm* y *taen* se comportan de otro modo, en este respecto, y frecuentemente tendremos oportunidad de comprobar que estas dos combinaciones divergen en muchos puntos de los demás híbridos alemanes.

Hay que mencionar también aquí que en los tritones recién metamorfoseados no se distinguen todavía caracteres sexuales y que sólo el examen histológico de las gonadas nos proporciona datos sobre este punto.

A continuación analizaremos los resultados en dos partes: tratará la primera del desarrollo de los animales examinados, ya sean híbridos o formas puras, desde el huevo hasta la metamorfosis; la segunda abarcará el desarrollo de las gonadas y todas las cuestiones referentes al problema de la relación numérica entre los sexos.

EL DESARROLLO DE LOS ANIMALES

1. *Tanto por ciento.*—El cuadro I proporciona una visión de conjunto de la cantidad de huevos fecundados artificialmente en el curso de tres años y de los gérmenes, larvas y jóvenes obtenidos en cada caso: en total unos 7.000 huevos y unos 800 a 900 tritones que hemos podido seguir en su desarrollo hasta la metamorfosis. Pero estas cifras dan sólo una idea imprecisa, porque las distintas combinaciones han sido numéri-

Fig. 4:
T. taen. ♀
× *palm.* ♂.

Fig. 5:
T. palm. ♀
× *taen.* ♂.

Fig. 6:
T. taen. ♀
× *alp.* ♂.

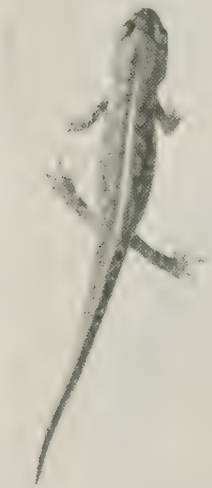
Fig. 7:
T. alp. ♀
× *taen.* ♂.

Fig. 8:
T. palm. ♀
× *alp.* ♂.

Fig. 9:
T. alp. ♀
× *palm.* ♂.

(× 1,5. Fotografias.)

10



11

12

a b c

13

Fig. 10: *T. palmatus* ♀ × *cristatus* ♂.—Fig. 11: *T. taeniatus* ♀ × *cristatus* ♂. Fig. 12: *T. alpestris* ♀ × *cristatus* ♂.—Fig. 13: a), *T. boscai* ♀ × *T. boscai* ♂; b), *T. palmatus* ♀ × *boscai* ♂; c), *T. palmatus* ♀ × *palmatus* ♂. (× 1,5. Fotografías.)

camente muy desiguales. Tenemos, pues, que seguir cada combinación separadamente [1].

Comencemos con la combinación *taentaen*, repetida en tres años consecutivos. Las observaciones generales que hagamos sobre esta combinación valen para todas las demás. Hemos fecundado 525, 212 y 117 huevos, de los cuales comenzaron a desarrollarse 153, 139 y 58, respectiva-

14

15

16

Fig. 14: *T. alpestris* ♀ × *alpestris* ♂ —Fig. 15: *T. taeniatus* ♀ × *marmoratus* ♂. Fig. 16: *T. marmoratus* ♀ × *marmoratus* ♂. (× 1,5. Fotografías.)

mente. Hay que observar lo siguiente: me había propuesto registrar el comienzo del desarrollo en la fase de mórula, entre las 16 y las 20 horas después de la fecundación artificial; pero la experiencia me demostró repetidamente que no debía confiar de un modo absoluto en mi propia observación, pues más de una vez encontré mayor número de néurulas que de mórulas contadas anteriormente, es decir, que mi observación había sido inexacta. En muchos casos la opacidad de la membrana

[1] Faltan en este cuadro los resultados de los experimentos con las especies españolas; las cifras, por las deficiencias ya señaladas, son demasiado pequeñas y podrían dar margen a conclusiones erróneas.

CUADRO I

EL TANTO POR CIENTO DE DESARROLLO DESPUÉS DE LA FECUNDACIÓN ARTIFICIAL EN LAS ESPECIES PURAS Y EN LOS HÍBRIDOS DBL GÉNERO *Triton*. 1931-1933

Combinación pura o híbrida.	Huevos.	NÉURULAS		LARVAS		JÓVENES	
		Número absoluto	% en relación con los huevos	Número absoluto	% en relación con las neurulas	Número absoluto	% en relación con las larvas
1	2	3	4	5	6	7	8
1931. *Triton taeniatus* ♀ × *taeniatus* ♂	525	153	29,2	131	85,6	86	65,7 [1]
1932. — — —	212	139	65,6	133	95,7	? [2]	—
1933. — — —	117	58	50,0	56	96,5	? [2]	—
— *cristatus* ♀ × *cristatus* ♂	245	36	14.7	19	52,8	2 (+ 17) [3]	—
— *palmatus* ♀ × *palmatus* ♂	339	195	57,5	166	85,1	95 (+ 37) [4]	79,5
— *alpestris* ♀ × *alpestris* ♂	114	64	56,1	59	92,2	48	81,4
— *taeniatus* ♀ × *palmatus* ♂	495	16	3,23	15	93,8	11	73,3
— *palmatus* ♀ × *taeniatus* ♂	538	159	29,6	120	75,5	96	80
1932. — *taeniatus* ♀ × *alpestris* ♂	354	13	3,67	10	76,9	7	70
1933. — — —	298	20	6,71	15	75	10	66,7
— *alpestris* ♀ × *taeniatus* ♂	456	34	7,46	30	88,2	27	90
— *palmatus* ♀ × *alpestris* ♂	648	140	21,6	109	77,9	55 (+ 18) [5]	67,1
— *alpestris* ♀ × *palmatus* ♂	365	60	16,4	49	81,7	34 (+ 1) [4]	71,4
1931. — *taeniatus* ♀ × *cristatus* ♂	1.151	318	27,6	271	85,2	124	45,8 [1]
1932. — — —	133	62	46,6	52	83,9	29 (+ 17) [3]	—
1933. — — —	127	57	44,9	55	96,5	20 (+ 31) [4]	94,6
— *cristatus* ♀ × *taeniatus* ♂	416	2	0,48	—	—	—	—
1932. — *palmatus* ♀ × *cristatus* ♂	52	26	50,0	26	100	7	26,9
1933. — — —	313	138	44,4	111	79,9	76 (+ 11) [4]	78,3
— *alpestris* ♀ × *cristatus* ♂	221	31	14,0	28	90,3	21	75
Suma.....	7.119	1.721		1.455		758 (+ 132)	

[1] Muchos individuos murieron al llegar a la metamorfosis.
[2] No cuidados hasta el final.
[3] Comidos por los *Cyclops*.
[4] Matados poco antes de la metamorfosis.
[5] De estas 18 larvas, 17 mostraban un gran atraso en su desarrollo (véase pág. 34).
Los tantos por ciento se refieren siempre a la suma *inmediatamente* precedente.

exterior dificultaba la comprobación [Spemann (1901) habla, como llevo dicho, de esta «capa pegajosa exterior de la cápsula externa del huevo» que dificulta luego la observación de éste]. He elegido, pues, como punto de referencia el de la neurulación (estado 16/18 de Glaesner, canal medular hasta tubo medular), que descarta toda posibilidad de error por las formaciones ostensibles en la superficie del germen.

No cabe dudar que desde la primera segmentación hasta la neurulación hay un enorme trecho, por lo que no está justificado apreciar por la última la proporción en que los huevos habían comenzado a desarrollarse. Por esta razón hice algunas pruebas que me permitiesen observar exactamente la primera segmentación y seguir la evolución de los huevos. Los de cuatro cultivos fueron colocados en portaobjetos y dispuestos en cuatro series de cinco huevos cada una; en dos de los cuatro cultivos (véase cuadro II), de un total de 61 huevos *taentaen* (número 226) y 62 huevos de *taencrist* (núm. 227) hemos registrado, al cabo de cinco horas [1], la primera segmentación, sincrónicamente en ambas combinaciones, en 33 y 10 casos, respectivamente. A la mañana siguiente, en la combinación *taentaen,* conté 35 mórulas y tres segmentaciones completamente irregulares («barocke Teilungen»), incapaces *eo ipso* de desarrollo, y en la de *taencrist* 14 mórulas y una segmentación irregular (también en este caso, pues, me habían pasado inadvertidos algunos huevos en desarrollo); además, de otros dos cultivos (números 228/229), en que no había tenido en cuenta la primera segmentación por haber ocurrido durante la noche, resultaron, de 56 huevos *taentaen,* 23 mórulas y tres segmentaciones irregulares, y de 65 huevos *taencrist,* 43 y una, respectivamente. Luego, sumando los resultados de las combinaciones iguales (prescindiendo de las segmentaciones irregulares), de los 117 huevos de dos cultivos *taentaen,* que habían dado

[1] Glaesner, en la «Normentafel», editada por Keibel, con gran sorpresa nuestra indica un cuarto de hora para la primera segmentación de *taentaen* y diez horas para la formación de la mórula, todo lo cual sólo tiene sentido teniendo en cuenta que Glaesner considera como punto de partida la *puesta* de los huevos y no su fecundación *natural,* que, desde luego, habrá ocurrido mucho antes (¿en la cavidad cloacal?); en cambio, Born (1892) cita a Grönroos: «dass bei gewöhnlicher Zimmertemperatur die erste Furche an reifen Tritoneiern 5-6 Stunden nach der Besamung auftritt (gemeint sind natürlich Uteruseier)...» Podría quizá interpretarse del mismo modo la observación de Fankhauser (1934 a), en huevos de *Triton,* de que no se encuentran figuras mitóticas antes de la quinta hora después de la «inseminación» (entrada del espermatozoide en el citoplasma del óvulo), aun cuando en su caso se trata de núcleos espermáticos aislados en fragmentos de huevo sin núcleo.

58 mórulas, se lograron 56 larvas, lo que arroja una pérdida de sólo dos gérmenes, y de un total de 127 huevos de los dos cultivos *taencrist*, que habían producido 57 mórulas, resultaron 55 larvas, es decir, también sólo dos gérmenes perdidos.

Como en estos cultivos he podido comprobar, con toda certeza, que los huevos que han efectuado simultáneamente y con normalidad la primera segmentación (las formas irregulares tardan algo más en aparecer) terminaron, casi sin excepción, normalmente su desarrollo hasta el

CUADRO II

COMPROBACIÓN DEL DESARROLLO

Combinación	Signatura del registro	Número de huevos	Número de gérmenes en la 1.ª segmentación regular	Número de gérmenes con segmentación irregular	Número de mórulas	Número de larvas
1	2	3	4	5	6	7
taeniatus ♀	226	61	33	3	35	56
×						
taeniatus ♂	229	56	?	3	23	
taeniatus ♀	227	62	10	1	14	55
×						
cristatus ♂	228	65	?	1	43	

estado de larva, y como lo mismo ocurrió en los casos en que la primera observación se hizo en el estado de mórula, me parece justificada la conclusión de que, en la práctica, todos los huevos, ya sea la fecundación por la misma especie o por cruzamiento, cuando han comenzado el desarrollo, lo prosiguen hasta el final [1]. Me parece, pues, justificado, para nuestro objeto, el equiparar los resultados obtenidos en el estado de la neurulación con el principio del desarrollo.

Volvamos ahora a las cifras de partida. En la tercera columna del cuadro I encontramos el tanto por ciento de los huevos desarrollados: 29,2 %, 65,6 % y 50 %. El escaso tanto por ciento del primer año de trabajo (1931) hay que atribuirlo, en parte, a falta de práctica; de lo mismo

[1] Muchos autores [Baltzer (1930), Fankhauser (1934 b), Newman (1914)] han observado que precisamente la gastrulación es lo que representa un momento muy crítico en el desarrollo; pero en el caso de los híbridos del género *Triton* parece seguro que el momento decisivo en el desarrollo está entre la fecundación y la primera segmentación.

adolecen los resultados del cruce de *taen* y *crist* en aquel año, como puede verse fácilmente por comparación con los posteriores. Pero, con todo, no deja de sorprender el que sea tan bajo el tanto por ciento de los otros dos años, pues se debería esperar una cifra mucho más cercana a 100. El hecho es que también las combinaciones puras *palmpalm* y *alpalp* dan, análogamente, este tanto por ciento bajo. Si bien en algunos cultivos especiales se obtiene una u otra vez un coeficiente de desarrollo muy próximo a 100 (por ejemplo, el núm. 168 de la combinación *palmpalm*, con 38 huevos desarrollados de 41 en total), los resultados de conjunto están muy alejados, sin embargo, de este ideal. Si otros autores obtienen resultados mucho más satisfactorios (Bataillon, 1929 [1]), hay que admitir que intervienen en mis experimentos defectos de técnica que, en cualquier caso, se manifiestan siempre, en los resultados, de manera uniforme. Uno de los factores es, por ejemplo, la imposibilidad de eliminar de la preparación, antes de la fecundación artificial, todos los huevos que tengan alguna lesión imperceptible, pero suficiente para impedir el desarrollo normal. No hay que descartar tampoco la posibilidad de que, al impregnar los huevos con el líquido seminal, queden algunos, por descuido, sin impregnación; cuanto mayor sea la cantidad de huevos que tengamos en un vidrio de reloj, tanto mayor debe ser la posibilidad de error en este sentido, aunque en realidad no puedo afirmarlo por experiencia: el procedimiento de rodear cada huevo con una capa visible de líquido seminal proporciona cierta garantía a este respecto. Cabe además preguntar qué tanto por ciento de los huevos fecundados *naturalmente* es capaz de desarrollo. No tengo experiencias sobre las proporciones efectivas en la naturaleza, pero hay indicios de que no llega al 100 % ni mucho menos, a juzgar por el desarrollo de los huevos que los animales silvestres, antes de ser sacrificados, depositan en el musgo o en el agua (número 196, «*alp nat.*»; de unos 160 huevos depositados en un acuario en la noche del 24 al 25 de abril de 1933, se desarrollaron en total 30. Número 197, «*palm nat.*»; de 350 huevos depositados aquella misma noche, unos 80). También la observación de Wolterstorff (1903) apoya esta opinión: «es ist Tatsache, dass schon unter normalen Verhältnissen, im Freien, ein Teil der Amphibieneier nur *unvollkommen* oder gar nicht befruchtet wird».

Volvamos al desarrollo de los huevos *taentaen*. De los gérmenes se

[1] Dice dicho autor con respecto a esto: «Dans les deux combinaisons *Molge palmata* ♀ × *Molge alpestris* ♂, *Molge palmata* ♀ × *Molge marmorata* ♂ la fécondation au sperme légèrement bromuré (3 %) peut donner jusqu'à 75 ou 80 % de clivages normaux (on ne saurait attendre mieux d'une fécondation pure)».

desarrollaron, desde la neurulación hasta salir del huevo, el 85 %, 95 % y 98 %, respectivamente, en los años 1931, 1932 y 1933. La pérdidas, que son, pues, insignificantes, están, a mi parecer, perfectamente dentro de lo normal y se refieren a casos como los de gérmenes en que una pequeña porción de vitelo no toma parte en el desarrollo y es eliminada luego («Extraovat», Spemann), de gérmenes con deformaciones o de alguno cuyo desarrollo ha quedado interrumpido; también en este caso el tanto por ciento de desarrollo de 1931, notablemente menor que en los años siguientes, se debe atribuir a falta de práctica. De los 131 individuos salidos del huevo alcanzaron la metamorfosis, como se ve en el cuadro, 86, o sea el 65,7 % (en los dos años siguientes, por falta de tiempo y de espacio, hemos sacrificado los animales de la combinación *taentaen* antes de llegar a esta fase). Este tanto por ciento es también demasiado bajo y proporciona una idea errónea de las posibilidades de desarrollo; vemos que las cifras restantes de los animales metamorfoseados son siempre relativamente mayores (de las excepciones hablaré más adelante). Las pérdidas se explican por la siguiente razón: en el primer año de trabajo murieron muchos animales al pasar de la vida acuática a la terrestre, peligro del que he hablado anteriormente (pág. 20) y evitado en general en los años siguientes.

Si continuamos considerando las formas puras, encontramos *cristcrist* con un valor bajísimo de desarrollo, lo que ya hemos indicado y discutido en la página 23. Además, la mayor parte de estas larvas fué víctima de los *Cyclops*, lo que también ocurrió en el cultivo de *taencrist* del mismo año, con una pérdida de otras 17 larvas. Las dos combinaciones puras *palmpalm* y *alpalp* presentan valores de desarrollo muy próximos entre sí, algo más del 50 %. El desarrollo posterior mostró resultados muy satisfactorios: 85 % y 92 %, respectivamente, de los gérmenes, dieron larvas, y de éstas llegaron a la metamorfosis 79 % y 81 %, respectivamente.

El cuadro cambia cuando pasamos a ocuparnos de las combinaciones híbridas. Por lo que se refiere al comienzo del desarrollo, *taencrist* y *palmcrist* dan resultados semejantes, oscilando las cifras alrededor del 45 %; *alpcrist*, por el contrario, sólo arroja el 14 %, y a este último nivel, poco más o menos, se mantienen las restantes combinaciones, salvo *cristtaen* que constituye una excepción, como hemos visto, pues sólo dos huevos iniciaron el desarrollo, sin llegar siquiera a la gastrulación. Cuando los resultados de dos años distintos son enteramente análogos no debemos atribuirlo a una simple casualidad.

De los tres grupos de combinaciones recíprocas, la *taenalp* y la

palmalp se comportan análogamente a sus recíprocas respectivas, en cambio la combinación *taenpalm* da un desarrollo muy diferente que su recíproco; pero, a mi juicio, las cifras absolutas son aún demasiado pequeñas y, para sacar conclusiones válidas, los resultados numéricos necesitan confirmación por nuevos experimentos.

Mientras que las primeras cifras, que expresan el valor del desarrollo inicial, varían considerablemente, las del estado siguiente (eclosión) muestran regularidad mucho mayor, oscilando entre el 75 y el 100 %. Tampoco es grande la pérdida de individuos hasta la metamorfosis (menos del 30 %) a excepción de dos casos: *taencrist* y *palmcrist*. Mientras que muchos *taencrist* se ahogaron en 1931 por las causas señaladas, la pérdida de casi tres cuartos de *palmcrist* se debió a que de esta combinación tuve en 1932 un solo cultivo (núm. 138), cuyos individuos fueron todos anómalos. Ya he hablado con detención de este caso en mi trabajo recientemente publicado en esta Revista (1935), así como del hecho de que, al año siguiente, esta combinación demostró vitalidad semejante a la de las otras combinaciones híbridas.

Este 30 % de pérdidas entre la eclosión y la metamorfosis, se debe, en gran parte, a individuos que, si bien consiguieron salir del huevo, fueron incapaces de tomar el alimento, o animales defectuosos o hidrópicos (Glücksohn, 1932) que sucumbieron en cuanto quedó consumido el vitelo. Fuera de éstos, no murió casi ningún individuo en el estado de larva; luego, un poco antes o durante la metamorfosis, murieron algunos más, sin que a este respecto se puedan establecer diferencias en el comportamiento entre las combinaciones puras y las híbridas. La causa se debe buscar, sin duda, en el hecho de que la metamorfosis trae grandes transformaciones fisiológicas, que algunos ejemplares débiles no están en condiciones de resistir. Debo manifestar aún que, por falta de tiempo, he tenido que matar buen número de larvas bien desarrolladas a las que faltaba ya poco para la metamorfosis; sólo en la combinación *palmalp*, entre los animales sacrificados, hubo 17 larvas de diferentes cultivos que, comparadas con ejemplares de otros de la misma combinación, mostraban un gran atraso en su desarrollo.

Quiero señalar, como resumen del cuadro, que se puede apreciar en general una gran pérdida de individuos hasta la neurulación; pérdida mucho mayor entre las formas híbridas que en las puras. En cambio, en el ulterior desarrollo embrionario y en el período larval, el tanto por ciento de pérdidas es pequeño y uniforme [1].

[1] Ha de extrañar sin duda, al comparar este cuadro con los siguientes, que el número de individuos de cada combinación a veces no es el mismo en los distin-

2. *Duración.*—La duración del desarrollo embrionario oscila entre 11 y 20 días; puedo confirmar enteramente la opinión de algunos autores (SPEMANN, 1918, por ejemplo) de que este desarrollo depende mucho de la temperatura. Por el contrario, la duración del período larval parece menos dependiente de ésta. La época de cría se extiende desde abril hasta septiembre y no hay diferencia apreciable en la duración del desarrollo de las primeras y de las últimas larvas, distanciadas entre sí casi exactamente en un mes. De todos modos, se procuró evitar, en lo posible, las grandes oscilaciones de temperatura en el laboratorio.

El cuadro III da el promedio de duración del período larval de todas las combinaciones obtenidas por fecundación artificial. También a este respecto llama la atención el comportamiento de *taentaen* y *palmpalm:* ambas especies se desarrollaron, por término medio, en 70 días [1]; *alpalp* emplea, por término medio, 7 días menos; *cristcrist* 28 días más (por desgracia, esta cifra se basa sólo en dos casos). En los híbridos interesan mayormente los casos en que se han logrado las combinaciones en ambos sentidos porque en ellas se puede estudiar mejor la influencia de cada progenitor. Así, las combinaciones *taenpalm* y *palmtaen* tienen, por término medio, un desarrollo mucho más breve (17 y 10 días menos, respectivamente) que las especies progenitoras. En las cuatro combinaciones entre *taen* y *alp,* y *palm* y *alp,* que siguen en el cuadro III, encontramos que todas las veces en que *alp* es la especie madre la duración del desarrollo es mucho menor, pues invierten en él sólo 50 y 49 días, respectivamente; en cambio, en las combinaciones recíprocas en que *alp* es la especie padre, la duración es bastante mayor, se aproxima siempre a la de la especie pura *alp*, y aun puede excederla. De las tres combinaciones con *crist*, la *taencrist* y la *palmcrist* tienen una duración que se aproxima a la media entre la de los respectivos componentes puros; en cambio la

tos cuadros. Esto se explica por varias razones: 1.°, en el número de los animales metamorfoseados figuran también los que se han escapado en la metamorfosis; 2.°, para el examen histológico se han utilizado también algunas larvas; 3.°, en el primer año, sobre todo, hemos dejado sin medir bastantes animales; otros no los hemos podido medir porque les habíamos cortado la punta de la cola para el examen citológico (aun no realizado); otros, en fin, no los hemos podido medir por el extraordinario encorvamiento de la columna vertebral. KLATT (1928) ha observado muchas veces curvatura de columna vertebral como consecuencia de alimentación no variada; estas curvaturas, cuando se presentan en mis cultivos, deben su origen a defectos de desarrollo desde la fase embrionaria.

[1] La duración media, en el caso de *palm,* hablando exactamente, es algo mayor, ya que habría que tener presente, para evaluarla, las 37 larvas sacrificadas poco antes de la metamorfosis que no se incluyeron en el cálculo.

CUADRO III

DURACIÓN MEDIA, EN DÍAS, DEL PERÍODO LARVAL DE LOS TRITONES OBTENIDOS POR FECUNDACIÓN ARTIFICIAL. 1932-1933

Combinación pura o híbrida.	M ± m	σ	n. individuos
1	2	3	4
Triton taeniatus ♀ × *taeniatus* ♂	70,53 ± 1,12	8,83	62
— *palmatus* ♀ × *palmatus* ♂	70,35 ± 0,90	8,79	95
— *alpestris* ♀ × *alpestris* ♂	63,71 ± 0,68	4,68	42
— *cristatus* ♀ × *cristatus* ♂	98,5	—	2
— *taeniatus* ♀ × *palmatus* ♂	53,55 ± 1,43	4,74	11
— *palmatus* ♀ × *taeniatus* ♂	60,60 ± 0,68	6,65	96
— *taeniatus* ♀ × *alpestris* ♂	60,31 ± 2,66	10,65	16
— *alpestris* ♀ × *taeniatus* ♂	50,24 ± 1,16	5,80	25
— *palmatus* ♀ × *alpestris* ♂	65,17 ± 1,39	9,41	46
— *alpestris* ♀ × *palmatus* ♂	49,67 ± 0,74	4,28	33
— *taeniatus* ♀ × *cristatus* ♂	81,62 ± 1,57	7,99	26
— *palmatus* ♀ × *cristatus* ♂	78,47 ± 1,25	10,98	77
— *alpestris* ♀ × *cristatus* ♂	60,60 ± 2,25	10,06	20

tercera, *alpcrist*, presenta una duración mucho menor (60 días en total). Es como si la presencia de *alp*, como madre, tendiera a reducir considerablemente la duración del período larval. Las tres gráficas adjuntas (figuras 17, 18 y 19) se refieren a las tres combinaciones y sus recíprocas, ya mencionadas, entre *taen*, *palm* y *alp*, ilustrando en detalle lo que hemos manifestado. Aunque la terminación del período larval (gráfica fig. 17) de *palmtaen* (combinación representada por 96 individuos) se extienda hasta la terminación del mismo período en las especies puras progenito-

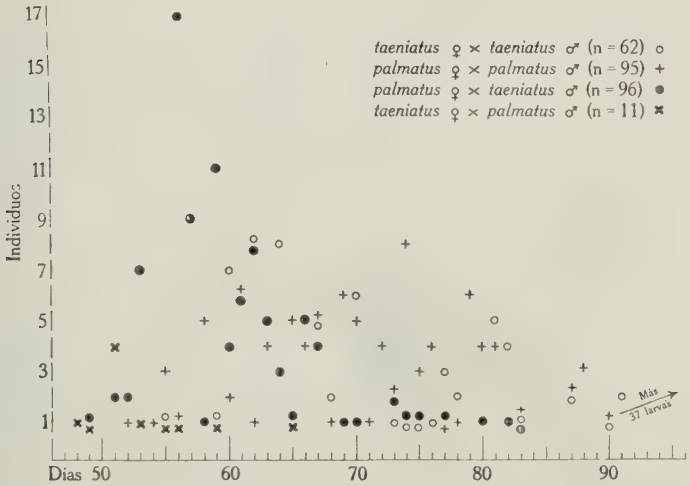


Fig. 17.—Duración del período larval de las combinaciones de *taeniatus* y *palmatus*. (En esta gráfica y en las dos siguientes figuras 18 y 19, los híbridos, aunque sean de distintas combinaciones, van designadas por iguales signos gruesos, para que se destaquen de los de las formas progenitoras.)

ras, es evidente que la mayoría de los mencionados híbridos está ya en metamorfosis antes que la mayoría de los individuos de dichas especies puras. En este caso, en que los híbridos se desarrollan con mucha mayor rapidez que las dos especies progenitoras, se podría hablar con razón de «heterosis» (vigor híbrido).

En la misma forma se explicaría el comportamiento de las combinaciones entre *taen* y *alp* (gráfica fig. 18), pero el número de híbridos es muy pequeño en este caso para que constituya una demostración rigurosa. Además, la combinación *taenalp* presentó un caso aislado de metamorfosis a los 90 días, sobre el que conviene hacer observar lo siguiente: este ejemplar, cuya metamorfosis se retrasó tanto respecto a la

de sus compañeros de la misma combinación híbrida, mostraba una anomalía en el comer, según ya he señalado en mi trabajo anterior (1935), y hubo de ser mantenido hasta la metamorfosis, con alimento reducido a tamaño pequeñísimo. A esta condición anormal parece deberse el retraso en el desarrollo de este animal. Sobre la influencia de la alimentación habitual en la duración del desarrollo y en el tamaño que alcanzan los animales en el momento de la metamorfosis, nos ocuparemos más adelante (pág. 44); si prescindiésemos de este individuo, veríamos en la gráfica una

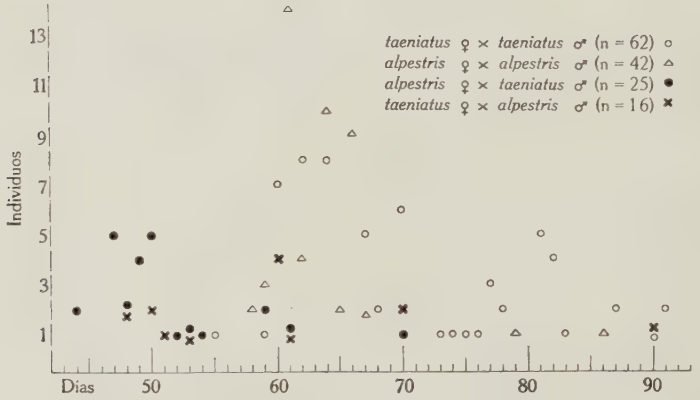


Fig. 18.—Duración del período larval de las combinaciones de *taeniatus* y *alpestris*.

reducción aún mayor del período de desarrollo. También la tercera gráfica (fig. 19), referente a los híbridos entre *palm* y *alp*, muestra una reducción clara en la duración del período larval de *alppalm;* pero en el caso inverso, *palmalp*, se registra en todo el período de su desarrollo larval una distribución uniforme respecto a las formas puras.

3. *Caracteres híbridos.*—Me limitaré aquí a exponer algunas observaciones sobre las diferencias existentes durante el período larval entre los híbridos y las especies puras de que proceden, refiriéndome sólo a las más dispares, como *taen* y *crist* o *bosc* y *marm*. Al principio de aquel período predominan visiblemente en los híbridos los caracteres de la especie materna, sobre todo en el tamaño y la coloración: es posible que la herencia plasmática, de la que se ha supuesto depende considerablemente la constitución general del grupo zoológico, represente el papel decisivo en este respecto. Pero, ya mucho antes de que la coloración total del animal nos dé indicios sobre su carácter híbrido (lo que ocurre

en las cuatro semanas anteriores a la metamorfosis), hay un momento decisivo del desarrollo: la formación de las extremidades posteriores. Glücksohn, en 1932, ha señalado, entre otras características, un retardo considerable en el desarrollo de todos los órganos de *crist* con respecto a *taen*, especialmente en el de las extremidades posteriores.

Era, desde luego, interesante averiguar el comportamiento de los híbridos. Me había llamado ya la atención el hecho de que el desarrollo de los híbridos se aproximaba en aquel respecto más a la especie padre;

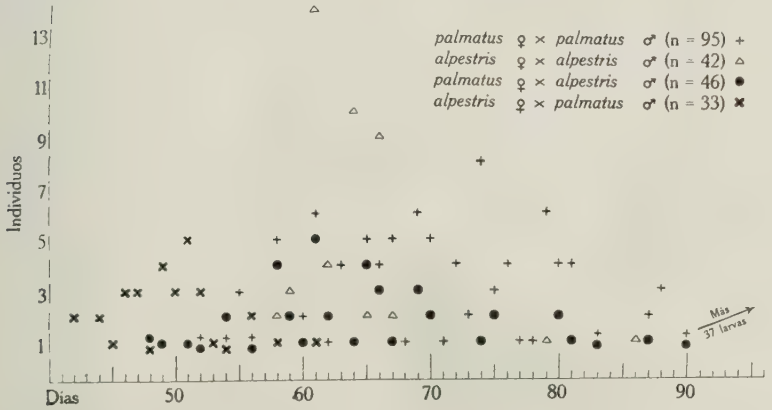


Fig. 19.—Duración del período larval de las combinaciones de *palmatus* y *alpestris*.

en 1934 y 1935, en Madrid, he intentado observarlo detenidamente, y aunque todavía son escasos los pormenores que conozco, los señalaré por cuanto muestran un interesante comportamiento híbrido. He utilizado para ello las especies *bosc* y *marm:* la primera, en su comportamiento biológico y morfológico, se aproxima probablemente mucho a *taen* (aunque no tenemos todavía la prueba), y la segunda, a *crist* (de lo que sí tenemos pruebas por los experimentos de Bataillon). Los resultados que obtuve con *bosc* y *marm* parecía, pues, probable que fuesen también válidos para *taen* y *crist*. Ahora bien, hemos apreciado una diferencia notable en el desarrollo de las extremidades posteriores entre *boscbosc* o *palmbosc* (que en su comportamiento biológico hay que considerarla igual a la *palmtaen*), de una parte, y *marmmarm* o *boscmarm* o *bosccrist*, de otra. Las yemas, o primeros rudimentos, de las extremidades posteriores aparecieron en *boscbosc* alrededor del 10.° día después de la eclosión; en el caso de *marmmarm* tardaron unos 30 días y en los

híbridos *boscmarm* y *bosccrist* se notaron a los veinte a treinta días. Luego, las extremidades de *boscbosc* llegaban más rápidamente a ser utilizables: muy pronto se separaban del cuerpo hasta quedar perpendiculares a él y servían para la estabilidad del animal; en cambio, en el caso de *marmmarm* y de los híbridos *boscmarm* (y *bosccrist*), los rudimentos de las extremidades posteriores quedaron aplicados a los lados del tronco hasta unos 12 días aproximadamente.

También la comparación de las falanges de las extremidades de los híbridos podría proporcionar interesantes datos, pues, en su crecimiento relativo, se distinguen muy marcadamente en las falanges de las dos especies puras (véase también Glücksohn, 1932).

4. *Tamaño de los animales metamorfoseados.*—Nos interesa finalmente el tamaño que alcanzan los híbridos al producirse la metamorfosis, y, junto a ello, también el tamaño de las especies puras obtenidas por fecundación artificial, así como el de todos los animales criados en cautividad. Se debe comparar el tamaño de todos estos animales con el de los tritones de la naturaleza, porque las proporciones del cuerpo tienen suma importancia para nuestro estudio crítico de las gonadas, su formación y desarrollo. Esta comparación es tanto más inexcusable cuanto que la alimentación no variada y las restantes condiciones de ambiente en la cautividad crean un medio anormal que podría quizá motivar cambios fundamentales en la disposición de los individuos. Los trabajos de Klatt (1926 y 1928) sobre experimentos de alimentación de tritones han demostrado ya que en el caso de una alimentación a base exclusiva de almejas, las larvas tienen un período de desarrollo mayor que con una alimentación de carne de cangrejo o de «plankton» y «da nun andrerseits der Längenzuwachs in gleicher Zeit bei gleicher Futtermenge derselbe ist bei M[uschelfleisch] und K[rebsfleisch]-Tieren, so ist ohne weiteres klar, dass die M-Tiere grössere Längenwerte erreichen als die K-Tiere». Tendremos, pues, que comparar no sólo el tamaño de las larvas desarrolladas en la naturaleza y el de las obtenidas en cautividad, tanto por fecundación natural como artificial, sino también el tamaño alcanzado en relación con la duración del período larval, según los datos del cuadro III, lo que nos permitirá ver si los nuestros son iguales a los de Klatt. Los 30 ejemplares de *taentaen* y los 12 de *cristcrist* (cuadro IV) que he designado con la denominación de «nat. lib.», es decir, desarrollados en la naturaleza y obtenidos consiguientemente por fecundación natural, llegaron a mis manos como larvas crecidas y entraron rápidamente en metamorfosis, la mayoría a los cuatro o cinco días. No puede admitirse, pues, que el breve tiempo que pasaron en el laboratorio ejerciese una in-

CUADRO IV

LONGITUD MEDIA, EN MILÍMETROS, DE LOS TRITONES METAMORFOSEADOS. 1931-1933 [1]

Combinación pura o híbrida. 1	M ± m. 2	σ 3	n. individuos. 4
Triton taeniatus ♀ × *taeniatus* ♂ nat. lib. [2]	34,7 ± 0,31	± 1,68	30
— — — art.	26,3 ± 0,30	± 2,41	64
— *cristatus* ♀ × *cristatus* ♂ nat. lib.	73,4 ± 1,94	± 6,74	12
— — — art.	72,5	—	2
— *palmatus* ♀ × *palmatus* ♂ nat. caut.	23,6 ± 0,22	± 1,46	46
— — — art.	26,00 ± 0,29	± 2,55	79
— *alpestris* ♀ × *alpestris* ♂ nat. caut.	35,8 ± 0,56	± 2,82	25
— — — art.	37,2 ± 0,48	± 3,23	46
— *taeniatus* ♀ × *palmatus* ♂ artificial	27,1 ± 0,67	± 2,12	10
— *palmatus* ♀ × *taeniatus* ♂ —	26,2 ± 0,24	± 2,24	90
— *taeniatus* ♀ × *alpestris* ♂ —	32,1 ± 0,91	± 3,41	14
— *alprestris* ♀ × *taeniatus* ♂ —	34,4 ± 0,57	± 2,80	24
— *palmatus* ♀ × *alpestris* ♂ —	25,3 ± 0,39	± 2,55	42
— *alpestris* ♀ × *palmatus* ♂ —	29,1 ± 0,30	± 1,70	32
— *taeniatus* ♀ × *cristatus* ♂ —	39,4 ± 0,50	± 4,36	119
— *palmatus* ♀ × *cristatus* ♂ —	37,5 ± 0,50	± 4,35	75
— *alpestris* ♀ × *cristatus* ♂ —	42,3 ± 0,71	± 3,00	18

[1] Medidas tomadas desde el extremo del hocico hasta la punta de la cola.
[2] nat. = combinación obtenida por fecundación natural.
art. = combinación obtenida por fecundación artificial.
lib. = crianza en libertad.
caut. = crianza en cautividad.

fluencia apreciable sobre el comportamiento de estos animales. Si comparamos, en cuanto a la medida, los criados en la naturaleza con los de cautividad y obtenidos por fecundación artificial, tendremos que la longitud media, en el caso de *taentaen*, presenta una diferencia considerable, a saber, de 8 mm. a favor de los silvestres [1]. En el caso de *cristcrist* la diferencia es mucho menor y en el mismo sentido; pero la medida media de los animales obtenidos por fecundación artificial y criados por consiguiente en cautividad, es todavía insegura por el corto número de ejemplares logrados (sólo dos). De las dos especies puras *palm* y *alp* hemos comparado sólo los animales obtenidos por fecundación natural y artificial criados en el laboratorio; las medidas se aproximan mucho, y si son algo menores las de los individuos obtenidos por fecundación natural, ello se explica fácilmente porque fueron criados muchos juntos, con la consiguiente irregularidad en la alimentación, por falta de tiempo y de espacio.

Se puede afirmar, en general, de nuestros híbridos que su longitud está comprendida entre las de las especies puras que han originado la combinación, si bien la especie madre ejerce mayor influencia. Esto último sólo se puede comprobar, como es natural, en las combinaciones realizables en ambos sentidos. Se observa claramente esta influencia en las gráficas (véase la lámina I), que muestran al mismo tiempo la amplitud de la variación. Las gráficas de *taentaen* y *palmpalm* (lám. I, fig. 3) están casi dentro de los mismos límites, y por tanto las gráficas de sus respectivas combinaciones híbridas coinciden casi exactamente. Por el contrario, las combinaciones de *taen* y de *palm* con *alp* (lám. I, figs. 1 y 2) muestran la preponderancia de la especie madre: si ésta es la menor de las dos especies que entran en el cruce, el híbrido resulta también menor, por término medio, que en el caso contrario[2]. La gráfica 4 (lám. I) representa las tres combinaciones híbridas de *crist* y las cuatro formas puras correspondientes: *palmcrist* y *taencrist* presentan una gran amplitud en su va-

[1] A este propósito debo hacer una rectificación que se refiere a las cifras de mi primera publicación (1932). Cuando tuve necesidad de estudiar animales criados en la naturaleza sólo pude conseguir material conservado en formol; mis cifras se referían a 10 larvas de *taen* que parecían estar próximas a la metamorfosis y cuya longitud media era de 45,4 mm. Hoy no me cabe la menor duda de que se trataba de larvas neoténicas, que, según Wolterstorff (1925) y Franz (1924), no son raras en *taen*. Hay que observar además, como afirma también Klatt (1926), que la metamorfosis trae consigo una reducción de uno a tres milímetros aproximadamente por atrofia de la cola.

[2] Véanse las figuras fotográficas 4-16, que están hechas todas a la misma escala (× 1,5).

riación; sus gráficas no se separan, pues, apreciablemente de la de *alpcrist*, pero a primera vista se percibe que las tres gráficas se encuentran entre las de las respectivas especies madres y la de la especie padre común.

La representación gráfica del tamaño medio (fig. 20) resume de nuevo los resultados obtenidos: *palm*, ya sea como padre o como madre, actúa como «inhibidora» del crecimiento y también en la forma pura presenta el valor más bajo, algo menor que el de *taen*, que son análogas también en cuanto al tamaño. *Alp*, ya sea como padre o como madre (prescindiendo de la combinación *palmalp*), favorece considerablemente el crecimiento, y en combinación con *crist* (éste como padre) produce el híbrido de máxima longitud. El componente *crist* estimula siempre el crecimiento; aun una especie tan pequeña como *palm* (que, como acabamos de ver, causa el efecto contrario), en combinación con *crist*, da una generación híbrida que, por término medio, es 11,5 mm., mayor que la especie pura *palm* [1].

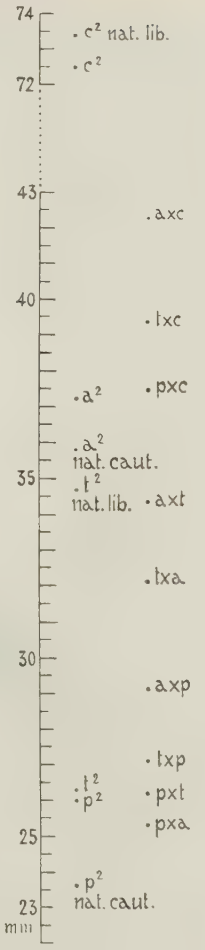


Fig. 20.—Tamaño medio de los tritones estudiados después de la metamorfosis de especie pura y de combinación híbrida. (Las combinaciones van designadas por iniciales; el exponente indica combinación pura. En cuanto a la significación de «nat.», «lib.», «caut.», véase la nota 2 al pie del cuadro IV.)

Citaré aquí las opiniones de dos autores en cuanto al tamaño y duración larval. Estoy completamente conforme con la de Glaesner, que establece la eclosión a los 16 días (su estado 35/37) de la fecundación (o, mejor dicho, de la puesta del huevo; véase nota al pie, pág. 30), cuando el animal alcanza un tamaño de 24 mm., y la metamorfosis a los 75 días (su estado 56) de la puesta de los huevos. Por el contrario, los datos de Glücksohn sobre este punto difieren mucho de los citados de Glaesner y de los míos. Glücksohn dice que las larvas salen del huevo, por término medio, a los siete días (estado 36 de Harrison y 32 (?) de Glaesner); fija luego la metamorfosis entre los 105 y los 125 días (estado 62 de Harrison y 53 de Glaesner). Aun teniendo presente que Glücksohn cuenta la vida del animal a partir de la puesta de los huevos y que en el presente trabajo se cuenta separadamente la vida larval,

Comparemos nuevamente los resultados de este cuadro (IV) con los del anterior (III). Habría que esperar que los animales de mayor tamaño, como se consigna en la cita de KLATT (pág. 40), tuviesen también un período más largo de desarrollo; pero la realidad es que la combinación híbrida que da los animales de la máxima longitud es precisamente la que tiene el período larval más corto. Podría pensarse que estos animales fueron alimentados con especial predilección y que por ello habrían terminado su desarrollo en un período más breve; pero ello está en contradicción con mi experiencia de que precisamente los animales mal alimentados suelen iniciar la metamorfosis antes del momento en que se habría de esperar a juzgar por el tamaño. Creo, pues, que, aun cuando entre las condiciones de alimento, la duración del período larval y el tamaño del cuerpo existe indudablemente relación, de tal modo que fuertes anomalías en la alimentación (como el hambre o la administración de glándula tiroide que trastorna el equilibrio endocrino) han de ejercer una gran influencia sobre ambos valores, el tiempo transcurrido hasta la metamorfosis y la longitud del cuerpo son, sin embargo (dentro de la variación normal del medio), completamente independientes entre sí y parecen determinados genéticamente en cada especie.

El resultado fundamental que se desprende de la consideración de lo precedente es, en mi opinión, el comprobar que existe diferencia de tamaño entre los animales *taentaen* desarrollados en la naturaleza y los criados en cautividad, lo que hace suponer que también el tamaño de los individuos de las especies *palm* y *alp*, en cautividad, ha de ser menor, en algunos milímetros, que el de los individuos de la naturaleza. También en los híbridos obtenidos en el laboratorio habría que esperar un tamaño algo mayor si fuese posible hacer que luego se criasen en la naturaleza. Hemos, pues, de tener en cuenta más adelante esta circunstancia para apreciar la medida en que estas deficiencias de la experimentación pudieran influir sobre la cuestión que pasamos a tratar: el grado de desarrollo de las gonadas de las distintas combinaciones puras e híbridas al tiempo de la metamorfosis [1].

---

es decir, desde la eclosión, siempre queda una diferencia de 17 a 37 días entre sus datos y los míos, y todavía más comparándoles con los resultados de GLAESNER. No puedo explicarme la razón de esta diversidad.

[1] Antes de cerrar el capítulo del crecimiento en longitud quisiera mencionar un hecho que está estrechamente relacionado con la alimentación: la longitud del intestino. KLATT (1926), en sus experimentos, encontró que la alimentación exclusivamente por carne (en oposición a la natural) trae como consecuencia el acortamiento del intestino; al llegar la metamorfosis, los tritones criados en la naturale-

EL DESARROLLO DE LAS GONADAS Y LA RELACIÓN NUMÉRICA ENTRE LOS SEXOS

El problema que pasamos a tratar es el siguiente: ¿a qué punto de desarrollo han llegado las gonadas al tiempo de la metamorfosis?, ¿hay que admitir efectivamente, como se podría suponer, que las condiciones de alimentación tienen una importancia tan decisiva, hasta el punto de que los animales criados en la naturaleza (que son, como hemos visto, notablemente mayores que los de cautividad) posean gonadas más desarrolladas?

Antes de contestar a estas preguntas nos ocuparemos de la histología de las gonadas y de las diferencias que existen entre los ovarios y los testículos. Ya desde el trabajo de Abramowicz en 1913 sabemos que se produce una diferenciación sexual desde una fecha relativamente temprana del estado larval: desde que las larvas, según sean hembras o machos, tienen 12,4 ó 15,9 mm. de longitud, se desarrollan las gonadas en dos sentidos opuestos; pero—y en ello coinciden las investigaciones más recientes de los autores que se han ocupado de la diferenciación sexual (Beaumont, 1933; Pariser, 1932)—la diferencia entre las gonadas hasta la formación de los oocitos o de las ampollas testiculares consiste únicamente en que los ovarios tienen una cavidad central o luz («Lumen»), mientras que los testículos son compactos. Desde luego, se trata de una diferenciación un poco tosca, y, aunque basta en general en la práctica y hasta facilita bastante la identificación, la falta de signos finos de diferenciación histológica o citológica constituye un grave inconveniente para reconocer posibles desviaciones de lo normal. En los casos en que se han descrito hasta ahora formaciones hermafroditas en tritones (Dubois y Beaumont, 1927, y Křiženecký, 1917), había oocitos entre las ampollas testiculares o en el interior de éstas. No hay en los tritones, como existe en los anuros (Witschi), división en capa cortical y médula, una de las cuales, según el sexo, alcanza un desarrollo considerable, formando en su seno las células germinales, mientras que la otra degenera. En los anuros se reconocen las anomalías ya por el cambio en la localización de las células germinales, pero este criterio no se puede aplicar a los uro-

---

za tienen el intestino largo, formando asas en la cavidad del cuerpo, mientras que los criados en cautividad lo tiene corto y más recto. Ya la alimentación, un poco más variada, del año 1933, con *Daphnia* y *Enchytraeus*, trajo como consecuencia una prolongación del intestino, aunque pequeña (véase Dürken, 1929, pág. 129).

CUADRO V

PROPORCIÓN SEXUAL EN *Triton*. 1931-1933

Combinación pura o hibrida.	♀ ♀ Gonadas con luz. 1)					?	♂	♂ ♂ Gonadas sin luz.				m = mazerada c = carencia.	Números totales.
	% ± m.	Suma.	(○○○)	(○○)	(○)			○	●	Suma.	% ± m.		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
T. taeniatus natural (libertad) (1932)	41,4 ± 9,15	12	12	—	—	—	—	17	—	17	58,6 ± 9,15	—	29
— — (cautividad) (1931)	32,6 ± 6,91	15	15	—	—	—	—	29	2	31	67,4 ± 6,91	—	46
— artificial (1931)	54,5 ± 5,25	48	45	1	2	—	—	29	11	40	45,5 ± 5,25	—	88
— — (1932)	43,1 ± 6,91	22	21	1	—	—	—	25	4	29	56,9 ± 6,91	—	51
	50,4 ± 3,85	70								69	49,6 ± 3,85		139
T. cristatus natural (libertad) (1932)	50,00 ± 11,79	9	9	—	—	—	—	9	—	9	50,00 ± 11,79	—	18
— artificial (1932)	50,00	1	1	—	—	—	—	—	1	1	50,00	—	2
T. palmatus artificial (1932)	46,9 ± 4,38	61	19	22	20	1	1	66	1	67	51,5 ± 4,38	—	130
T. alpestris natural (cautividad) (1933)	76,00 ± 8,54	19	—	2	17	—	—	6	—	6	24,00 ± 8,54	—	25
— artificial (1933)	44,2 ± 7,57	19	14	—	5	—	—	24	—	24	55,8 ± 7,57	—	43
T. taen ♀ × *palm* ♂ artificial (1932)	40,00 ± 15,49	4	—	—	4	—	—	6	—	6	60,00 ± 15,49	—	10
T. palm ♀ × *taen* ♂ — (1932)	51,6 ± 5,18	48	—	6	42	—	1	38	6	44	47,3 ± 5,18	—	93
T. taen ♀ × *alp* ♂ — (1932)	100	6	1	1	4	—	—	—	—	—	—	—	6
— — — (1933)	100	10	1	—	9	—	—	—	—	—	—	—	10
	100	16											16

T. alp ♀ × *taen* ♂ (1933)	—	90,5 ± 6,4		19	—	2	17	—	—	2	—	2	9,5 ± 6,4	—	21	
T. palm ♀ × *alp* ♂ (1933)	—	91,3 ± 3,39		63	—	—	63	—	5	—	—	—	—	1 m	69	
T. alp ♀ × *palm* ♂ (1933)	—	90,9 ± 5,01		30	—	1	29	—	2	1	—	1	3,0 ± 2,97	—	33	
T. taen ♀ × *crist* ♂ (1931)	—	98,4 ± 1,13		160 { 121	—	12	109	1	—	1	—	1	0,8 ± 0,8	—	123	162
— — — (1933)	—	100		39	2	6	31	—	—	—	—	—	—		39	
T. palm ♀ × *crist* ♂ (1932)	—	100	91,4	85 { 7	—	—	7	—	—	—	—	—	—	—	7	93
— — — (1933)	—	90,7 ± 3,13	2,91	78	—	1	77	3	3	—	—	—	—	2 c	86	
T. alp ♀ × *crist* ♂ (1933)	—	100		21	—	—	21	—	—	—	—	—	—	—	21	

PROPORCIÓN SEXUAL EN ESPECIES ESPAÑOLAS DE *Triton*. 1934

T. marmoratus natural (cautiv.)		50,00 ± 10,66		11	1	2	8	—	—	9	1	10	50,00 ± 10,66	—	21	22
— artificial				—	—	—	—	—	—	1	—	1		—	1	
T. boscai natural (cautiv.)		77,78 ± 13,86		7	1	5	1	—	—	2	—	2	22,22 ± 13,86	—	9	
T. bosc ♀ × *marm* ♂ artificial		80,00 ± 12,65	83,33 ± 10,76	8	—	—	8	—	—	2	—	2	20,00 ± 12,65	16,67 ± 10,76	10	12
T. bosc ♀ × *crist* ♂	—	100		2	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	2	
T. marm ♀ × *crist* ♂	—	—		1	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1	
T. palm ♀ × *bosc* ♂	—	—		—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	1	

1) Ovarios llenos de oocitos. Ovarios sin oocitos. ○ Testículos sin ampollas.
Ovarios con pocos oocitos. ● Testículos con ampollas.

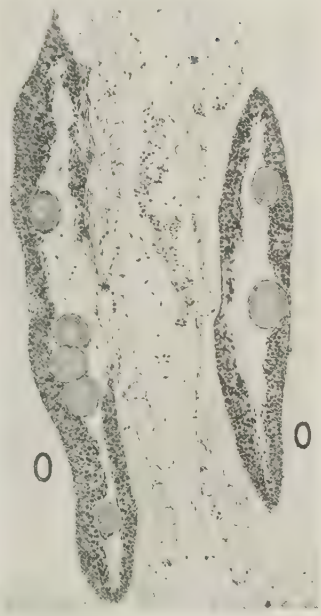
delos. En la fase de la metamorfosis, los testículos de las larvas de tritones desarrolladas en la naturaleza presentan las primeras generaciones de la espermatogénesis: grandes gonocitos y pequeñas espermatogonias agrupadas en «nidos» (véase Beaumont, 1933; Kleinschmidt, 1934). Los testículos son, por lo general, pequeños y fusiformes, pero en esta fase se encuentran también testículos mayores, en los que se pueden distinguir dos partes: una prominencia piriforme anterior y un pedúnculo posterior (Kleinschmidt, 1934). En este momento los ovarios han alcanzado un desarrollo superior al de los testículos [1]; contienen grandes cantidades de oocitos jóvenes, que forman salientes en la luz de la gonada, cubiertos de epitelio folicular, y en las capas periféricas se encuentran oogonias y también gonocitos, que en nada se diferencian de las fases iniciales de la espermatogénesis.

En el cuadro V están resumidos los resultados del examen completo de las gonadas. La primera línea se refiere a *taentaen*, criados en libertad: de 29 ejemplares, hubo 12 ♀♀ con ovarios que mostraban el desarrollo antes mencionado, es decir, que estaban llenos de oocitos; los testículos de los 17 ♂♂ mostraban, en mayor o menor grado, el desarrollo que acabamos también de describir. Si comparamos con éstos los *taentaen* desarrollados en cautividad, aunque procedentes de huevos fecundados naturalmente, tenemos resultados muy semejantes, con la sola diferencia de que entre los 31 ♂♂ se encuentran 2 en cuyos testículos estaban ya formadas las ampollas, en las condiciones en que Beaumont (1927) no las observó sino hasta algunos meses después de la metamorfosis. También los animales de la misma especie pura, obtenidos por fecundación artificial, muestran el mismo grado de desarrollo; pero entre las hembras se encuentran siempre algunas en que las gonadas no han avanzado tanto, y que podemos considerar como desmedradas [2]. En dos de estos ovarios menos desarrollados había sólo una pequeña cantidad de oocitos, otros dos carecían enteramente de ellos. Sobre la división de los ovarios en tres grados distintos de desarrollo, que figura en el cuadro V [con abundancia de oocitos (fig. 21); con pocos oocitos en el interior de una capa de oogonias, frecuentemente también de gonocitos (fig. 22); con

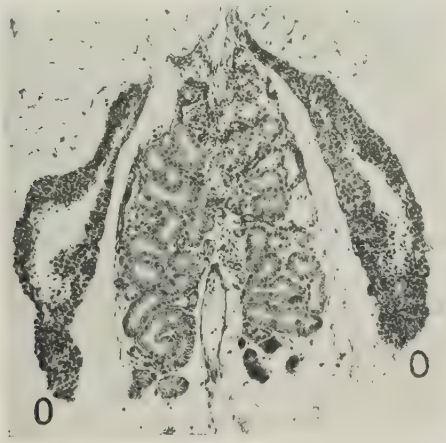
[1] Se pudiera creer que las hembras necesitasen también más tiempo para su desarrollo, como autorizaría a suponerlo la amplitud de la variación del período larval (cuadro III); pero un examen de mis datos sobre el comienzo de la metamorfosis da una serie que comprende indistintamente machos y hembras.

[2] Aunque en el año 1931 tomamos numerosas medidas, lo hicimos sin marcar los animales, de modo que en algunos casos no ha sido posible, por desgracia, precisar a qué animales pertenecían las gonadas observadas.

21



22



23

Fig. 21: Ovario (O) lleno de oocitos *(taentaen* 109 b, 1), correspondiente, en el cuadro V, a la columna 4 ○○○.—Fig. 22: Ovario con pocos oocitos *(taencrist* 35,14), correspondiente a la columna 5 ⊙.—Fig. 23: Ovario sin oocitos *(palmpalm* 168,3), correspondiente a la columna 6 ⌒. (× 42. Microfotografías.)

ausencia total de oocitos (fig. 23)], hay que decir que sólo es riguroso el límite entre la ausencia total y la existencia de los oocitos; el otro límite es puramente convencional y en muchos casos resulta discutible la inclusión en una u otra categoría. Esta división tiene por único fin distinguir de los demás los ovarios insuficientemente desarrollados que jamás hemos encontrado, hasta ahora al menos, en los individuos criados en la naturaleza. En los machos obtenidos por fecundación artificial, los testículos se encuentran, generalmente, en la fase de formación de gonocitos y arquegonias (fig. 24), y sólo pocos provistos de ampollas (fig. 25).

Así, pues, de la comparación entre el tamaño de los individuos (tanto de la naturaleza, como de los, mucho menores, criados en la cautividad, obtenidos por fecundación natural y artificial) con sus respectivas gonadas, resulta que se puede afirmar que no hay una diferencia fundamental en cuanto al *grado* del desarrollo de éstas; hecho que nos hace recordar la observación de Klatt (1926) de que también en sus experimentos los individuos de naturaleza y de cautividad, de la misma especie, muy divergentes en cuanto al tamaño, se corresponden morfológicamente con exactitud.

Existe, sin embargo, en las gonadas una diferencia notable en cuanto a las dimensiones según se haya criado el animal en la naturaleza o en cautividad. El cuadro VI da algunas medidas de gonadas de distinta procedencia: el grueso de las gonadas se ha calculado por la suma de los cortes frontales y la longitud se ha medido directamente con el micrómetro ocular. Hay que señalar que estas medidas tienen un valor muy relativo y sólo son capaces de dar una idea vaga del tamaño de las gonadas, por lo que no vale la pena de calcular el promedio. Entre las deficiencias inevitables de la medición se cuentan las siguientes: 1.ª, en muchos casos los ovarios no tienen la forma de sencillos sacos, sino que están constituídos por lóbulos; 2.ª, la anchura mayor (que no hemos medido) no siempre coincide con la longitud máxima; 3.ª, si la dirección del corte es algo oblicua, se aumenta desproporcionadamente el número de cortes; 4.ª, muchas gonadas tienen forma de gancho, y en este caso parte de la gonada queda cortada longitudinalmente, y parte, transversalmente; 5.ª, otras son encorvadas en forma de salchicha, de modo que los cortes frontales no las alcanzan en toda su longitud y, para calcular ésta, se hace preciso medir la distancia entre los dos cortes parciales de los extremos. En algunos casos en que faltaba un extremo de la gonada he debido resignarme a evaluar aproximadamente el grueso, pero se trata de muy pocos cortes y su suma total no puede modificar apreciablemente los resultados. A pesar de los defectos indicados, creo que el

cuadro proporciona algunos datos interesantes e instructivos. Tenemos, por ejemplo, que una hembra *taentaen* de la naturaleza (caso 1.° del cua-

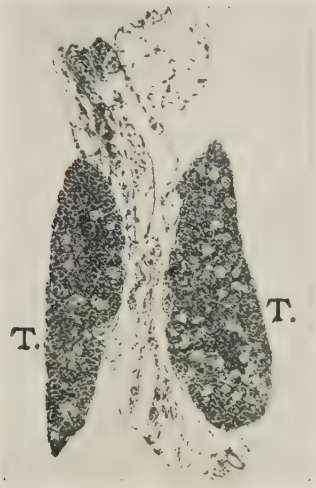


Fig. 24.—Testículo (T) sin ampollas *(taentaen* 174,6), correspondiente, en el cuadro V, a la columna 9 ○. (× 42. Microfotografía.)

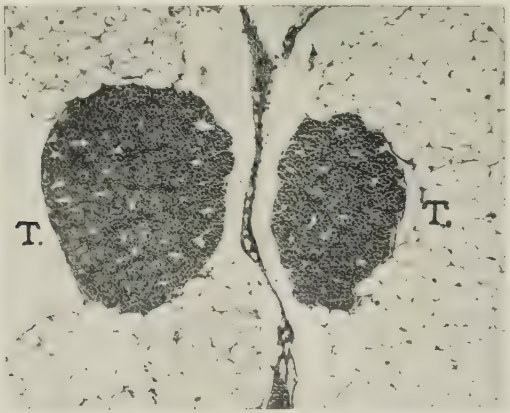


Fig. 25.—Testículo (T) con ampollas *(taentaen* 109 b, 14), correspondiente, en el cuadro V, a la columna 10 ●. (× 42. Microfotografía.)

dro VI), tomada al azar, presenta un ovario bien desarrollado que es casi de doble grueso, aunque no mucho más largo, que el de otra hembra

CUADRO VI

MEDIDAS DE LAS GONADAS

Combinación pura o híbrida. 1	Origen. 2	Signatura del registro. 3	Sexo: Desarrollo alcanzado [1]. 4		Cuerpo: Longitud. 5	Las dos gonadas: Anchura. 6	Las dos gonadas: Longitud. 7	Observaciones [2]. 8
1. *Triton taen* ♀ × *taen* ♂	Natural Libertad	174,3	♀	(♂♂)	36 mm.	700 μ 930	2.052 μ 1.710	
2. — *taen* ♀ × *taen* ♂	Artificial	109 b, 1	♀	(♂♂)	24	480 430	1.710 1.710	
3. — *crist* ♀ × *crist* ♂	Natural Libertad	175,1	♀	(♂♂)	75	1.150 800	2.850 4.275	
4. — *crist* ♀ × *crist* ♂	Natural Libertad	175,6	♀	(♂♂)	80	1.560 —	—	
5. — *crist* ♀ × *crist* ♂	Artificial	122,1	♀	(♂♂)	70	1.200 —	2.736 1.938	El final evaluado aproximadamente.
6. — *taen* ♀ × *crist* ♂	Artificial	288,4	♀	(♂♂)	69	1.600 —	3.534 —	No completa del todo; el animal tenía 19 meses.
7. — *taen* ♀ × *crist* ♂	Artificial	228,29	♀	(♂♂)	?	620 480	2.622 3.021	Larva próxima a la metamorfosis.
8. — *taen* ♀ × *crist* ♂	Artificial	228,34	♀	(♂)	?	270 350	2.337 1.881	Larva próxima a la metamorfosis.
9. — *taen* ♀ × *crist* ♂	Artificial	37,2	♀	(♂)	? [3] 36	370 410	1.938 2.280	
10. — *taen* ♀ × *crist* ♂	Artificial	37,4	♀	(♂)	? 34,5	340 400	741 1.194	
11. — *taen* ♀ × *crist* ♂	Artificial	37,6	♀	(♂)	? 45	530 510	1.767 1.995	

12.	— *taen* ♀ × *crist* ♂	Artificial	52 d	♀	(○)	? 51	310 430	2.397 1.938	
13.	— *taen* ♀ × *crist* ♂	Artificial	35,8	♀	( )	? 47	450 390	2.850 3.135	
14.	— *taen* ♀ × *crist* ♂	Artificial	54,5	♀	( )	? 39	340 280	1.680 1.838	
15.	— *taen* ♀ × *crist* ♂	Artificial	56 c	♀	( )	? 37,5	520 770	721,6 369,6	Gonadas de paredes muy finas.
16.	— *taen* ♀ × *taen* ♂	Natural Libertad	174,24	♂	○	40	350 360	1.827 1.881	Inclusive los pedúnculos de 1.140 μ respectivamente. 855 μ
17.	— *taen* ♀ × *taen* ♂	Artificial	39 I	♂	○	? 21	400 360	616 1.021	Final evaluado. No tiene pedúnculo.
18.	— *taen* ♀ × *taen* ♂	Artificial	65 II	♂	◍	? 31	790 580	1.026 1.539	Final evaluado; la segunda medida inclusive pedúnculo de 399 μ.
19.	— *crist* ♀ × *crist* ♂	Natural Libertad	175,7	♂	○	77	790 750	3.021 2.052	Con pedúnculo; en otra corte de la segunda gonada que no interesaba el pedúnculo, el testículo solo medía 1.710 μ.
20.	— *crist* ♀ × *crist* ♂	Natural Libertad	175,9	♂	○	77	620 [4] 570	2.223 3.819	Con pedúnculo; en la segunda gonada el pedúnculo sólo media 2.565 μ.
21.	— *crist* ♀ × *crist* ♂	Artificial	122,2	♂	●	75	1.110 800	4.332 4.503	Inclusive los pedúnculos. 1.710 μ / 1.938 μ respectivamente.
22.	— *taen* ♀ × *crist* ♂	Artificial	64,1	♂	○	? 39	160 120	1.038 1.653	No tienen pedúnculo.

[1] Véase la llamada del cuadro anterior.

[2] Todos los animales a los que aquí se hace referencia, excepto el caso 6, fueron sacrificados poco antes o poco después de la metamorfosis.

[3] El interrogante indica que el autor no tiene seguridad de la correspondencia entre la gonada y el individuo expresado (véase pág. 22 y nota al pie [2] pág. 48).

[4] Además, 35 cortes de 10 μ, correspondientes al pedúnculo, que fué cortado transversalmente por hallarse orientado en dirección perpendicular al eje longitudinal del testículo.

taentaen (caso 2.°) de la misma edad obtenida en el laboratorio por fecundación artificial, pero que es 12 mm. menor.

Volvamos al cuadro V. He estudiado 9 ♀♀ y 9 ♂♂ *cristcrist* cogidos de la naturaleza; las hembras habían llegado al estado de la formación de oocitos; los machos, en cambio, no presentaban aún ampollas; sí las tenía, por el contrario, 1 ♂ *cristcrist* obtenido por fecundación

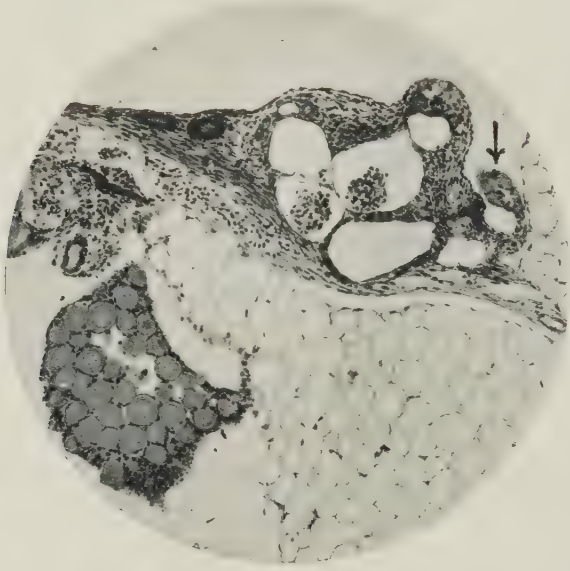


Fig. 26.—Anomalía de gonadas (la flecha indica la gonada anómala); *palmpalm* 173,25. (× 51. Microfotografía.)

artificial, y también los ovarios de la única ♀ *cristcrist* así obtenida estaban llenos de oocitos. La medición de las gonadas en el cuadro VI da para el caso de *cristcrist* (casos 3, 4, 5), correspondiendo a la mayor longitud del cuerpo, mayores dimensiones de los ovarios, tanto en longitud como en grosor. Lo mismo se puede decir del tamaño de los testículos (casos 19, 20 y 21); llama la atención el hecho de que el testículo del único macho obtenido por fecundación artificial, que presenta ampollas en éste, tiene sus dimensiones una mitad mayores que los testículos de los animales criados en la naturaleza.

En el caso de *palm* y en el de *alp* hay que señalar que el grado de desarrollo de los ovarios varía aún mucho más; una tercera parte,

casi con exactitud, de las gonadas de *palmpalm* se encuentra en cada uno de los tres grados mencionados de desarrollo, mientras que en el caso de *alpalp* los individuos se reparten, casi por mitad, entre los grados primero y tercero, quedando sólo dos individuos en el segundo Las experiencias con *taentaen* hacen pensar que las especies *palm* y *alp* se comporten análogamente en la naturaleza (quizá represente algún papel a este respecto el hecho de que proceden de montañas de elevación media, la temperatura de cuyas aguas, por ser más baja que en la llanura, pudiera influir en el desarrollo). Los machos de las especies puras mencionadas muestran el mismo grado de desarrollo; en el caso de *palmpalm* he encontrado, además, un animal sexualmente anormal (núm. 173,25), que tenía a un lado un ovario completamente desarrollado con oocitos y al otro una gonada rudimentaria en la fase de la gonocitosis (¿testículo?) (fig. 26). Ya al practicar la disección me había llamado la atención la desigualdad de tamaño de las dos glándulas sexuales; pero la experiencia me ha enseñado que una formación asimétrica de este tipo no indica necesariamente una desviación de lo normal; con mucha frecuencia la menor longitud se compensa con un mayor grosor, y recíprocamente. Quisiera señalar ahora—con la prudencia a que obligan las mencionadas fuentes de error en las mediciones—que, a juzgar por las medidas obtenidas, las dos gonadas de un animal coinciden hasta cierto punto en volumen, porque casi siempre, sobre todo cuando se trata de las gonadas normales de las especies puras, la gonada más gruesa es menos larga y la más delgada tiene mayor longitud.

Si, desde el punto de vista de la distribución de los individuos por sexos, consideramos las especies puras ya señaladas, no puede caber la menor duda de que, en los casos en que las cifras son lo bastante grandes para un examen estadístico, los individuos de uno y otro sexo están en proporción de 1 : 1; es decir, dan la razón que Correns llama «ideal» o «mecánica», que es lo que se ha de esperar, según las leyes de Mendel, de un cruzamiento retrógado monohíbrido: así se suele considerar la herencia del sexo como consecuencia de la heterogamecia de uno de los sexos.

Veamos también a este respecto, en la medida en que lo permitan los escasos resultados obtenidos—ya hemos indicado las causas—, el comportamiento de las especies españolas *bosc* y *marm*. De 9 ejemplares *boscbosc*, obtenidos por fecundación natural, hubo 7 ♀♀ y 2 ♂♂; el número es demasiado pequeño para sacar conclusiones sobre la relación numérica entre los sexos, pero supongo que una cantidad suficiente de individuos daría, también para esta especie, igual número de machos

que de hembras, es decir, en proporción de 1 : 1, como positivamente ocurre en *marm.* Llamó la atención que, como en el caso de *palm*, las dos especies españolas presentaban ovarios en grados muy diferentes de desarrollo.

Si pasamos ahora a los híbridos encontramos en general, en las hembras, un grado menor en el desarrollo de los ovarios; vemos sobre todo gonadas con gran luz, limitada por una capa más o menos gruesa de células germinales, gonocitos y oogonias, y vemos también algunas gonadas con pocos oocitos; los ovarios completamente llenos de oocitos constituyen una excepción. Del mismo modo se comportan las dos combinaciones entre *taen* y *palm:* en 93 individuos *palmtaen* hemos encontrado también uno sexualmente anormal (núm. 160, 7); la anomalía consistía en que la gonada de un lado tenía luz, y por consiguiente, a pesar de la falta absoluta de oocitos, hay que considerarla como ovario, mientras que la otra era maciza, y por tanto la interpreto como un testículo con signos típicos de degeneración en tejido conjuntivo. Por lo demás, en ambas combinaciones hubo aproximadamente igual número de machos que de hembras, es decir, estaban en proporción de 1 : 1. Esto es tanto más sorprendente cuanto que, como hemos de ver a continuación, en ninguno de los cruces restantes el resultado está en dicha proporción, nueva prueba de que aquellas dos especies son biológicamente mucho más próximas entre sí que las demás alemanas.

Por lo que se refiere a las especies estudiadas en España, desgraciadamente no me ha sido posible, como ya hemos dicho, comprobar su comportamiento entre sí y con las especies alemanas con la misma exactitud que he logrado hacerlo con parte de estas últimas. Supongo que el cruzamiento de *bosc* con *taen* y con *palm,* como ocurre en el de estos últimos entre sí, ha de dar híbridos hembras y machos en proporción de 1 : 1; en el caso de las dos combinaciones entre *marm* y *crist,* por falta de experiencia propia, he de valerme de la opinión expresada por carta por los expertos herpetólogos Wolterstorff y Lantz, según los cuales en ambas combinaciones, obtenidas por fecundación natural, se encuentra aproximadamente un 50 % de ♀♀ y un 50 % de ♂♂. En mis experimentos de 1934, *boscmarm* y *bosccrist* dieron, respectivamente, 8 y 2 ♀♀ del grado inferior de desarrollo, y de la primera de estas dos combinaciones resultaron también 2 ♂♂, sobre los que hablaremos después.

Volvamos a las combinaciones híbridas entre especies alemanas. En general encontramos un enorme déficit de machos; las hembras, en las distintas combinaciones, alcanzan del 90 al 100 % de los individuos.

En los casos en que hemos dispuesto de un gran número de individuos (*taencrist*, *palmcrist* y *palmalp*) no cabe la menor duda de que la ausencia de machos no constituye un resultado casual, sino que obedece a alguna causa. Los resultados ganan en fuerza probatoria en los casos en que la repetición de los experimentos en los años sucesivos ha mostrado el mismo fenómeno.

En estas circunstancias, el examen de las gonadas tiene aún mayor interés en las combinaciones híbridas con desviación de la razón sexual normal que en las formas puras o que en los híbridos en que los sexos están en proporción normal, ya que de la estructura de las gonadas se podrían extraer conclusiones sobre lo que haya ocurrido con los machos. Del cuadro V se desprende que sólo excepcionalmente (4 veces) se encontraron ovarios bien desarrollados y llenos de oocitos. La mayoría de los ovarios (363) estaba aún en el grado de la generación celular primitiva [1]; sólo un total de 23 gonadas contenían una pequeña cantidad de oocitos, y entre ellos bastantes casos uno sólo. No son raros tampoco entre estos híbridos los casos en que la estructura de las gonadas se aparta de lo normal: sólo de gonadas indiferenciadas hemos tenido 4 casos, que presentaban tal retardo en su desarrollo que no era posible diagnosticar en qué sentido continuaría éste. En estos casos las gonadas tienen forma de tiras a ambos lados de los riñones, unidos a los cuerpos adiposos por medio de suspensores mesentéricos (fig. 27); sólo contienen una pequeña cantidad de gonocitos. Si se encuentra un hueco entre la gonada y el cuerpo adiposo respectivo, este hueco, que corresponde a la cavidad sexual primaria («primäre Geschlechtshöhle», Witschi, 1929), puede fácilmente ser confundido con la verdadera luz del ovario, es decir, la cavidad sexual secundaria; por ello, en los casos de duda he examinado siempre si la luz, como verdadera cavidad del ovario, estaba circundada por todas partes por las células germinales.

Pero incluso entre las gonadas que debían considerarse como ovarios porque, aun careciendo de oocitos, estaban inequívocamente caracterizadas como tales por su estructura interna, es decir, por la existencia de luz verdadera, se presentaban una serie de anomalías que nunca habíamos visto en las formas puras. La forma más sencilla de alteración consiste en que la pared de células germinales, que limita la luz, va perdiendo grosor hasta quedar finalmente reducida a una delgada capa de células en la que

[1] Expondremos más adelante nuestra experiencia sobre el desarrollo y las posibilidades de maduración y reproducción con algunos híbridos criados en laboratorio hasta más de un año después de la metamorfosis; estos híbridos no figuran tampoco en el cuadro V.

están esparcidos los gonocitos (véase Pariser, 1932, fig. 2). Un paso más avanzado es la relajación de las capas celulares por la formación de grandes oquedades, unida a la disminución de las células germinales; finalmente se encuentran también gonadas que por degeneración pasan a tejido conjuntivo. En algunos casos me llamó también la atención la aglomeración de la cromatina de los gonocitos (véase el cuadro VII, en la columna «anomalías varias»).

Hasta aquí se ha tratado de modificaciones en las glándulas sexuales con tendencia al empobrecimiento del órgano, a la degeneración general, pero existen también casos en que las dos gonadas están formadas de

Fig 27.—Gonadas indiferentes (indicadas por las flechas); *taencrist* 44 c. (× 42. Microfotografía.)

modo desigual, y entonces la estructura de una de ellas podría interpretarse como si tuviera la tendencia a la diferenciación masculina. El criterio anatómico fundamental hasta ahora es, como hemos dicho, la existencia de luz o cavidad en la gonada. Así, pues, todas las modificaciones fundamentales que a ella se refieren, deben considerarse, primeramente, como expresión del cambio fisiológico de la gonada, y, en segundo lugar—en cuanto que no aparecen en las formas puras o sólo lo hacen excepcionalmente—, como relacionadas causalmente con la hibridación. Lo normal es que la luz sea continua en toda la longitud del ovario; cuando a primera vista no se observe esto, habrá que buscar la causa, casi siempre, en que la luz no se encuentra enteramente en el eje longitudinal del corte o en que la gonada está encorvada. Pero entre los híbridos hay ovarios en que la luz no es continua, sino interrumpida por puentes celulares (cuadro VII, núms. 199,1 (fig. 28), 228,27 y 205,2). Existen ade-

CUADRO VII.—GONADAS ANÓMALAS Y TESTÍCULOS EXCEPCIONALES

COMBINACIÓN 1	2 gonadas indiferentes 2	1 gonada con luz y la otra gonada sin luz 3	Gonada con enclavado 4	Testículos excepcionales 5	Anomalías varias 6	Deformidades (véase mi trabajo 1935, REVISTA ESPAÑOLA DE BIOLOGÍA) 7
Triton palm. ♀ × *palm.* ♂ art.	166,2	173,25				
— *bosc.* ♀ × *bosc.* ♂ art.			243,2			
— *palm.* ♀ × *taen.* ♂ —		160,7				
— *taen.* ♀ × *crist.* ♂ —	44, c [1]			64,1	42,1/14: tejido con oquedades. 228,7/8/17: oquedades en el tejido. 228,7/8: pocas células germinales 228,27: luz con puentes celulares	44, c.: espina idorsalis curvada. 64,3: extremdades posteriores deformadas. 42,11: extremidades posteriores deformadas.
— *palm.* ♀ × *crist.* ♂ —	190,4/6 191,3	220,4/6/7			191,1: 1 gonada indiferente. 219,9: pocas células germinales. 220,18: 1 gonada indiferente.	
— *alp.* ♀ × *crist.* ♂ —					198,1: tejido con oquedades. 235,4/5: pocas células germinales.	198,3/4/5: muy pequeños. 198,5/6: espina dorsalis curvada.
— *taen.* ♀ × *alp.* ♂ —			223,2		232,2/4: cromatina aglomerada.	
— *alp.* ♀ × *taen.* ♂ —				177 238,1		177: anomalía en el comer. 238,3: extremidades posteriores deformadas.
— *palm.* ♀ × *alp.* ♂ —		208,2/3/10 209,1 212,20	211,3/8 212,7			208,9: extremidad anterior derecha deformada. 212,19: 1 extremidad posterior con yema secundaria.
— *alp.* ♀ × *palm.* ♂ —		199,1 200,3	205,1	184,1	199,1: luz de 1 gonada con puentes celulares. 203,2/5: luz muy pequeña. 205,2: luz con puentes celulares.	184,1/2: extremidades posteriores deformadas.
— *bosc.* ♀ × *marm.* ♂ —				272,1/2	272, 1/2: tejido con oquedades.	

[1] El subrayado indica que el mismo individuo presenta también otra anomalía, mencionada en distinta columna.

más individuos cuyas gonadas no sólo presentan cierta asimetría en el examen macroscópico—ya hemos visto (pág. 55) que este hecho carece por sí solo de significación—, sino también en el anatómico: una gonada con su luz bien formada y la otra sin luz o con una mera hendidura en la base, que se extiende a pocos cortes y que, por otra parte, se puede considerar como homóloga de la luz verdadera (fig. 29). Estos casos de animales con sus dos gonadas muy diferentes los hemos encontrado 11 veces entre los híbridos (= 2,07 %) y una sola vez en la especie *palm*

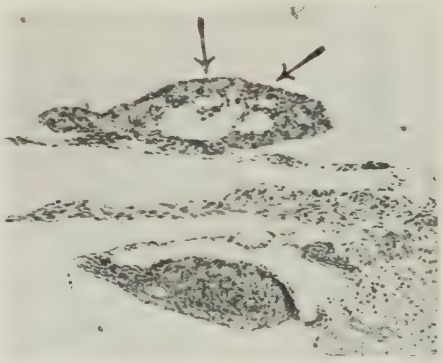


Fig. 28.—Gonada con puentes celulares (las flechas indican los puentes); *alppalm* 199,1 ♂. (× 62. Microfotografía.)

(caso, ya mencionado, núm. 173,25), lo que representa 0,22 % del total de individuos puros examinados.

La última clase de anomalías, y para mí quizá la más interesante, abarca los casos en que en el ovario existe un «enclavado». Así denomino un grupo de células peculiares, rodeado por todas partes de epitelio propio, a modo de quiste, situado en la capa de células germinales y que forma un saliente hacia la luz de la gonada. Hemos encontrado estos «enclavados» 5 veces en total en las gonadas de los híbridos (= 0,94 %); en las formas puras, en cambio, sólo una vez en un total de 463 gonadas examinadas (= 0,22 %), tratándose en este caso de un individuo *boscbosc* procedente de fecundación natural (núm. 243,2, véase cuadro VII). La figura 30 ilustra esta anomalía; en la luz forman saliente dos oocitos bastante grandes, entre los cuales se encuentra un cuerpo capsular, a modo de quiste, precisamente lo que hemos llamado «enclavado». Está lleno de células uniformes, redondas y pequeñas, en total unas 70 a 80; el grueso de este cuerpo es de unas 80 µ. En el mis-

mo corte se encuentran otros tres enclavados, rodeados de epitelio, pero las células que los forman son considerablemente mayores y no están distribuídas con la misma regularidad. Los enclavados comienzan en el tejido común de la gonada; sus células producen enteramente la impresión de células germinales. También las oogonias normalmente están reunidas en «nidos»; pero jamás he visto en éstos, ni siquiera aproximadamente, la cantidad de células que existen en un enclavado. Por otra parte,

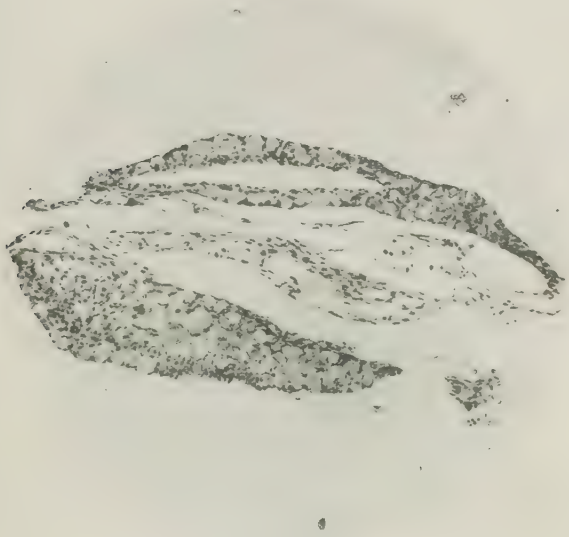


Fig. 29.—Gonada anómala, ♂; *palmalp* 208,2. (× 50. Microfotografía.)

el aislamiento completo de sus células sugiere la idea de que se trate de ampollas testiculares enclavadas; pero como la estructura de las espermatogonias y la de las oogonias, según hemos dicho, no se diferencia en nada, no podemos dar aún un juicio definitivo sobre la naturaleza de estas células. La otra gonada del mismo individuo se encontraba en estado de degeneración en tejido conjuntivo.

El segundo caso se refiere a un individuo de la combinación *alppalm* (núm. 205,1, cuadro VII, y figs. 31 y 32). También en él forma parte del tejido de la gonada y sale hacia la luz un cuerpo rico en células, de unas 90 μ de grueso. Las células pequeñas están ordenadas en dos series

concéntricas alrededor de una pequeña cavidad y están más aglomeradas que en el primer caso; algunos gonocitos grandes están en el borde del enclavado, ya que toda la gonada se encuentra en el grado de formación gonocitaria. También en este caso las células me parecen germinales, pero, del mismo modo que en el primero, la estructura no ofrece ningún indicio del carácter sexual de las células. Los dos individuos del mismo cultivo (núms. 211,3 y 211,8) de la combinación *palmalp* muestran las mismas condiciones; el núm. 212,7, de la misma combinación, presenta

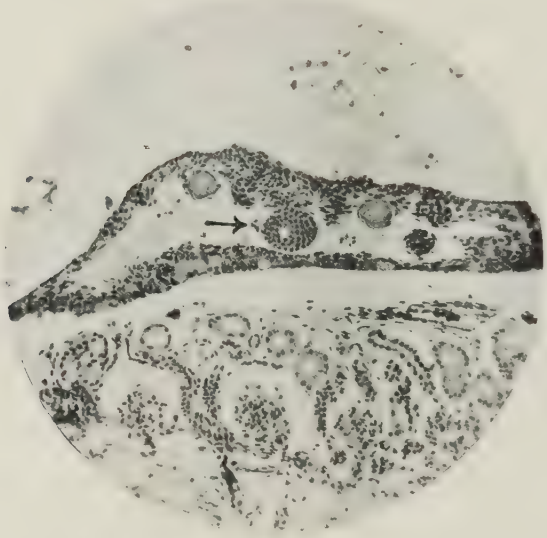


Fig. 30.—Gonada con «enclavado» (indicado por la flecha); *boscbosc* 243,2. (× 62. Microfotografía.)

más bien una protuberancia celular que forma saliente en la luz y no tiene epitelio propio que la separe del tejido que la rodea; su contenido consiste en gonocitos y es una simple continuación del tejido circundante. El individuo núm. 223,2 presenta de nuevo, junto a una pequeña cantidad de gonocitos marginales, acumulaciones de células provistas de epitelio y distribuídas concéntricamente al parecer; la gonada produce una impresión anormal porque la luz está dividida por completo por numerosos grupos de células.

Dejando aparte las dos combinaciones entre *palm* y *taen* en las que el número de hembras es casi igual al de machos, debo señalar en las

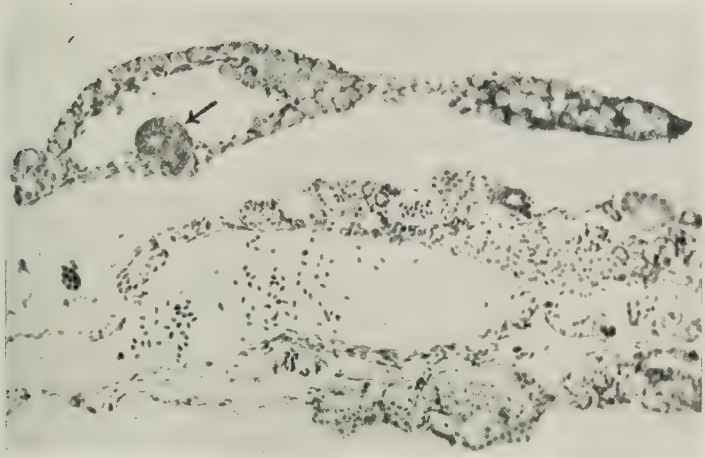


Fig. 31.—Gonada con «enclavado» (indicado por la flecha); *alppalm* 205,1. (× 62. Microfotografía.)

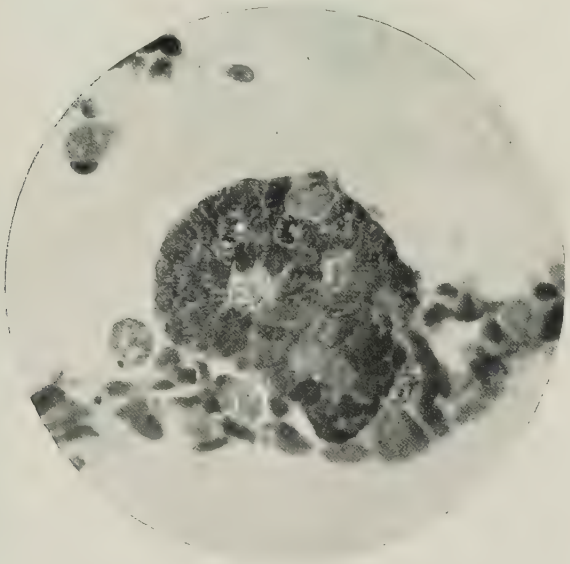


Fig. 32.—El «enclavado» de la microfotografía anterior con mayor aumento; *alppalm* 205,1. (× 420. Microfotografía.)

restantes combinaciones híbridas los pocos casos—6 individuos en total(1,45 %)—en que las dos gonadas están formadas como testículos; distingo estos últimos con el nombre de «testículos excepcionales», ya que aparecen en número pequeñísimo: un caso en *taencrist* (= 0,62 %), otro en *alppalm* (= 3,0 %), dos en *alptaen* (= 9,5 %) y dos en *boscmarm* (= 20 %). Salvo estos dos últimos (*boscmarm*), todos los demás tienen la estructura de los testículos normales en el grado inferior.

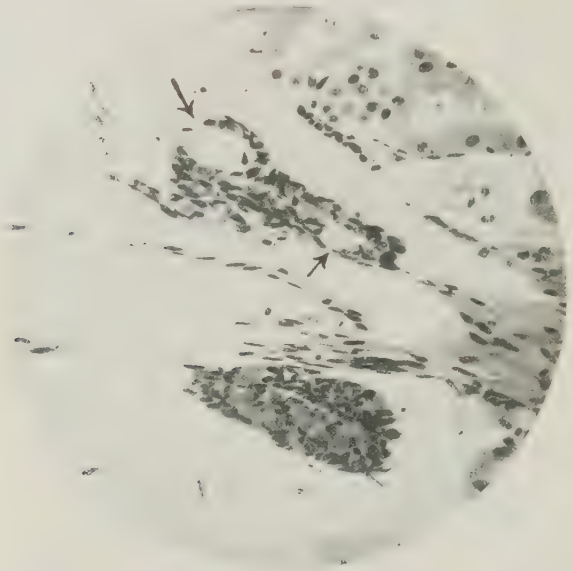


Fig. 33.—Testículo con grandes lagunas intercelulares (indicadas por las flechas); *boscmarm* 272,1. (× 170. Microfotografía.)

Los testículos de aquellos dos *boscmarm* muestran en su tejido grandes lagunas intercelulares (fig. 33); sobre esto, uno de ellos (el 272,1), además de las dos pequeñas gonadas piriformes, posee a un lado otra gonada suplementaria que por encontrarse muy distante (a 320 µ) de la otra del mismo lado deja descartada toda posibilidad de que formase parte de ella.

El cuadro VII presenta con detalles todos los casos en que la estructura de las gonadas se aparte de lo normal; estos casos ya están indicados en el cuadro V, con excepción de las gonadas con «enclavado», que incluímos entre las femeninas por un rasgo de su estructura anatómica

gruesa: la conformación de su cavidad, la luz. Del cuadro VII se desprende que las anomalías mencionadas aparecen múltiples veces en un mismo cultivo, repitiéndose casi siempre la misma anomalía. En la última columna, bajo el epígrafe «deformidades», hemos reunido todas las observaciones sobre anomalías de carácter anatómico y constitucional de los animales de que hemos tratado últimamente y de sus compañeros de cultivo lo que constituyó el tema de mi trabajo último (1935).

La pregunta de si las deformidades de los miembros o cualquier otra anomalía constitucional tiene relación con la formación anormal de la gonada, está tan justificada como la ya planteada acerca de la influencia del crecimiento y de la duración larval sobre el grado de diferenciación de las gonadas. Mientras que respecto a este último hemos comprobado que no existe tal influencia, por el contrario, sobre lo primero, encontramos aquí, en la mayor parte de los casos, una interesante correlación. En un total de 427 individuos de las combinaciones híbridas que muestran una proporción anormal entre los sexos se encuentran solamente 6 ♂♂ y de éstos uno (184,1) tenía las extremidades posteriores deformadas; en el cultivo de este macho y en los de otros dos machos (con extremidades normales) había hembras con las extremidades posteriores deformadas (184,2;64,3; 238,3); un cuarto animal (177) carecía de pigmento y se distinguió hasta que fué matado (poco después de la metamorfosis, como es costumbre) por una anomalía en el comer; se trata del mismo animal que, según hemos visto en las páginas 37-38, empleó en su desarrollo larval vez y media el tiempo que, por término medio, invirtieron los demás individuos de la misma combinación. También una parte de las restantes anomalías de las gonadas muestra paralelismo con otros defectos físicos, a los que, por lo común, se concede poca importancia.

De mi último trabajo se desprende, como ya lo había admitido Hamburger (1935), que las deformidades de las extremidades posteriores se encuentran en relación causal con la hibridación y que, además, estas deformidades sólo aparecen en las combinaciones en que se ha registrado una falta casi completa de machos. Una comparación entre la existencia de «testículos excepcionales» y la de anomalías en las extremidades, permite establecer un nuevo paralelismo: sólo hemos tenido animales con deformidades en las extremidades posteriores en combinaciones en que aparecían también los «testículos excepcionales». Aunque las cifras sean todavía demasiado pequeñas para poder hacer predicciones sobre el comportamiento de las combinaciones en que no se han encontrado hasta ahora ni «testículos excepcionales» ni deformidades en las extremidades posteriores, hay que ver, sin embargo, algo más que una casualidad en la

igualdad de comportamiento de *alptaen* y *alppalm*, y de *taencrist* y *boscmarm*.

EL EXAMEN DE SEIS HÍBRIDOS *CRISTATUS* ♀ × *TAENIATUS* ♂ OBTENIDOS POR EL DR. HAMBURGER

Como por mi parte no había obtenido resultados de cruzamiento entre *crist* y *taen*, hube tanto más de agradecer la amabilidad del doctor Hamburger, que actualmente trabaja en la Universidad de Chicago, al ofrecerme para estudio seis ejemplares de esta combinación, obtenidos por fecundación artificial. De estos 6 animales, según sus indicaciones, uno había sido matado poco antes de la metamorfosis; 4, un poco después, y uno, un año después de la metamorfosis, y, conservados, medían 36, 40 a 50 y 70 mm., respectivamente; hay que admitir que habían encogido algo con la conservación. El examen demostró que los 6 animales tenían en sus gonadas normalmente desarrollada la luz; es decir, que hay que considerarlos como hembras. A excepción del animal de un año, todas las gonadas se encontraban en el grado inferior del desarrollo, careciendo de oocitos, y, en 4 de estos 5 casos, las paredes de las gonadas eran delgadísimas. El animal de un año (llamado por Hamburger «c/t 15») requiere un interés especial, porque no conocíamos entonces nada del desarrollo sexual posterior a la metamorfosis, y cabía admitir las tres posibilidades siguientes: primero, desarrollo ulterior de los ovarios hasta la madurez sexual; segundo, degeneración posterior de los ovarios, y, tercero, transformación de los ovarios en testículos. El ejemplar «c/t 15» realizaba la segunda posibilidad: a pesar de unos pocos oocitos grandes, la gonada presentaba aspecto de avanzada degeneración. En la figura 34 el corte longitudinal de la gonada aparece enteramente irregular: las gonadas tienen que haber estado arrugadas y retraídas porque aparecen en los cortes a trechos; en el interior del tejido, que muestra muchas lagunas intercelulares, pero carece de gonocitos y oogonias, se puede reconocer un estroma coloreado con verde luz.

EL EXAMEN DE CINCO HÍBRIDOS *TAENIATUS* ♀ × *CRISTATUS* ♂ MÁS DE UN AÑO DESPUÉS DE LA METAMORFOSIS

Por fortuna he podido examinar, durante el último invierno, algunos animales *taencrist* (es decir, de la combinación recíproca de la últimamente mencionada), obtenidos en mis trabajos, que seguían viviendo más

de un año después de la metamorfosis. He de agradecer esta última circunstancia a la amabilidad de la dirección del Acuario de Berlín, que, al venirme a Madrid a continuar este estudio, aceptó el cuidado de 11 individuos de la combinación dicha, en parte larvas crecidas y en parte ya metamorfoseados. Desgraciadamente, la mayoría murió en el Acuario a consecuencia de una ola de calor en el verano de 1934, de modo que en diciembre del mismo año sólo encontré vivos dos. Pude examinar además otros tres conservados en formol. Estos últimos, que medían de 60 a 70 mm., habían sufrido ya una larga maceración; no obstante pudimos

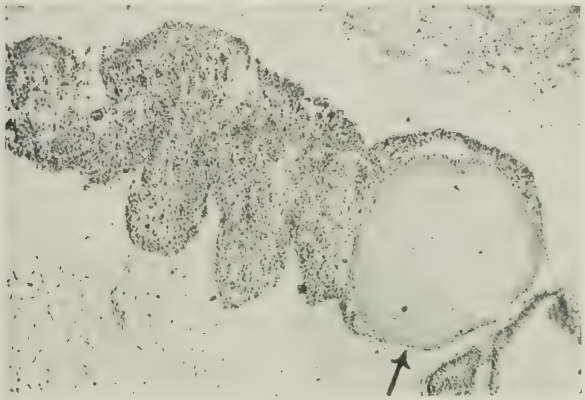


Fig. 34.—Ovario con un gran oocito (indicado por una flecha) en la combinación *T. cristatus* ♀ × *taeniatus* ♂, «c/t 15», Hamburger (× 45. Microfotografía).

comprobar en un animal algunos oocitos aislados; en los otros dos, a pesar de la ausencia de oocitos, la existencia de luz nos hace considerar sus órganos sexuales como ovarios.

De los dos animales que aun vivían uno medía 69 mm. y el otro 88 mm. Ya microscópicamente sus gonadas se podían reconocer como ovarios, y su examen microscópico demostró que estaban en un grado muy avanzado de desarrollo. Es verdad que el menor de los dos (número 4) no tenía aún ovarios muy desarrollados, pero estaban enteramente repletos de oocitos bastante grandes; el tamaño de uno de los ovarios aparece en el cuadro VI con número 6; el grosor, de 1.600 μ, y la longitud, de 3.534 μ, permiten cierta comparación con el tamaño de las gonadas ya estudiadas de los individuos recién metamorfoseados de la misma combinación y de las especies puras que en ella intervienen. El animal

mayor (núm. 5) presentaba ovarios cuyo grado de desarrollo podría compararse con el de los animales de la misma edad de la especie pura *taen,* aunque no tengo medidas exactas de esta última forma. En el caso de este individuo—y quizás también en el del anterior—creo poder asegurar que hubiera proporcionado huevos fecundables si hubiese alcanzado la edad a que los tritones hembras son capaces de reproducirse, lo que habitualmente ocurre a los dos años. De este modo creo que, por lo menos una parte de los híbridos de aquellas combinaciones de las que resultan únicamente hembras, podrían llegar a la capacidad de reproducción.

Pero ni aun este pronóstico ofrece perspectivas halagüeñas de cruzamiento que dé descendencia. Experimentos de este género han sido intentados ya por Bataillon y Tchou Su en 1932, los cuales, como he señalado al comienzo de este trabajo, página 23, han logrado obtener la mayor parte de los cruzamientos en que intervienen *marm* y *crist* con las especies *palm* y *alp.* Aunque después de registrar las distintas combinaciones obtenidas agregan: «Bien que ces produits soient souvent d'une belle vigeur, les mâles de 3, 4 ou 5 ans, n'ont jamais montré de parure nuptiale», no se desprende sin embargo, por desgracia, a qué combinaciones pertenecen los machos obtenidos; pero como ha trabajado preferentemente con cruzamientos entre *crist* y *marm,* supongo que estos machos pertenecen también mayormente a esta combinación. (No estaría, de ningún modo, en contradicción con mis experiencias el que también en las otras combinaciones se encontrase ocasionalmente algún macho.) Estos machos de la combinación *marm* ♀ × *crist* ♂ de Bataillon y Tchou Su tienen una espermatogenesis abortiva, y sólo las hembras proporcionan productos sexuales maduros. Los cruzamientos retrógrados con las dos especies puras progenitoras pudieron efectuarse por fecundación artificial; en uno de los dos sentidos (con *marm* ♂), los primeros pasos de la segmentación eran ya anormales; en el otro (con *crist* ♂), el desarrollo embrionario continuó casi hasta el final, pero no llegó a la eclosión ni una sola larva [1]. Si el cruzamiento artificial entre dos especies al parecer tan próximas en cuanto a sus condiciones biológicas como *crist* y *marm,* apenas ha dado

[1] Las experiencias de Lantz (1934) y Wolterstorff (1910) sobre híbridos de $F_1 \times P$, obtenidos por fecundación natural, son más favorables. Del cruzamiento retrógrado *cristmarm* × *crist* se ha logrado obtener y conservar—según dice Wolterstorff en su catálogo (1925)—varios embriones, normales unos y anormales otros, y varias larvitas enfermas en la eclosión o poco después de ella. Lantz señala el haber criado hasta la metamorfosis varias larvas obtenidas por las cuatro combinaciones posibles con *marm* y *crist* en la $F_1 \times P$, en las que el híbrido siempre intervino como madre, y el haber logrado 2 ♂♂ sexualmente maduros.

resultado positivo en la $F_1 \times P$, bien poco podrá esperarse del cruzamiento de especies tan alejadas como *taen* y *crist.*

EXPERIMENTOS ACERCA DE LA MADUREZ DE LOS HUEVOS

Antes de cerrar esta relación de mis trabajos y de pasar a una valoración de los resultados obtenidos, quiero mencionar aún dos series de experimentos, realizados sólo en pequeño número, pero que han de ser de interés para juzgar algunos complejos de cuestiones.

1. *Supermadurez.*—Estimulada por la lectura de un trabajo de R. Hertwig (1921) sobre la influencia de la supermadurez de los huevos en la relación numérica entre los sexos, comencé mis experimentos en 1931 con tentativas encaminadas a cambiar, mediante supermadurez de los huevos, dicha relación en los tritones. R. Hertwig había obtenido, en ranas, una gran preponderancia numérica de machos retardando la fecundación de los huevos uterinos hasta varios días después de cuando estuvieron a punto de ser puestos. La supermadurez parece favorecer la producción del sexo heterocigótico. Como entonces no sabía yo si la falta de machos en los tritones se refería a todos los animales obtenidos por fecundación artificial o si se limitaba a las combinaciones híbridas, y suponiendo—por analogía—que el tritón macho es heterocigótico, quise dilucidar esta cuestión disponiendo del siguiente modo mis experimentos: después de haber extraído, de la manera ya indicada, los huevos de los oviductos y antes de fecundarlos, los dejaba en la cámara húmeda 48 horas a lo sumo [1]. De esta manera he fecundado artificialmente 1.215 huevos (que no se han incorporado al cuadro I por haber sido demasiado diferentes las condiciones de la experimentación). De 577 huevos de *taen* puestos en contacto con esperma de *taen*, se desarrollaron 16 gérmenes, y de 589 huevos de *taen* con esperma de *crist* resultaron sólo 9 gérmenes. Finalmente, de todos estos gérmenes llegaron 10 larvas, en total, hasta la metamorfosis, a saber: 7 *taentaen* y 3 *taencrist*. El examen histológico demostró que de los 7 *taentaen*, 3 eran machos y 4 hembras, y que los 3 *taencrist* eran hembras. En este pequeño número de individuos, o bien no se observa ni aun la menor influencia de la supermadurez en la repartición de los sexos (pues éstos se presentaron dentro de cada com-

[1] No es conveniente proceder en sentido inverso, es decir, dejar los huevos en los oviductos hasta el mismo momento de la fecundación, pues en la cámara húmeda el epitelio del oviducto pierde su elasticidad y fácilmente se rompe, haciendo muy difícil el extraer los huevos sin dañarlos.

binación en proporción a como aparecen en los experimentos con huevos cuya fecundación no ha sido retardada); o bien, las 26 hasta 48 horas de retraso no bastan para alterar las «condiciones tróficas» (Witschi, 1923a) del huevo en el sentido de la supermadurez, lo que es posible, pues el intervalo entre la puesta y la fecundación en los experimentos de Witschi (1922), ejecutados con especies de rana, fué de sesenta y nueve horas a cuatro días. Como el conjunto de mis resultados de aquel año me reveló la relación de dependencia entre la hibridación y la desviación de la relación numérica entre los sexos, no intenté nuevos experimentos más amplios.

2. *Grados de madurez.*—Otra pequeña serie de experimentos debía responder a la siguiente cuestión: ¿existen grados en la madurez en los huevos y tendrían estos grados una influencia sobre el sexo de modo que los huevos de más tiempo (los más próximos a la desembocadura de los oviductos en la cloaca) tenderían, en su mayoría, a un sexo, y los de menos tiempo (los más cercanos a la trompa) al otro? Esta pregunta me parece justificada desde el punto de vista de Witschi (1922), que el huevo uterino no es una «célula en reposo» a pesar de que el núcleo—como añade—se queda varios días en el mismo estado (metafase de la segunda división de maduración): «Es nehmen in ihm bestimmte Prozesse chemischer Natur ihren Verlauf, die in ihren aufeinanderfolgenden Phasen sich als Vorreife, Reife, Ueberreife und Degeneration des Eies äussern». Bajo este aspecto, supuesto que la supermadurez origine preferentemente el sexo heterocigótico, se podría esperar un tanto por ciento más elevado del sexo homocigótico en huevos «menos» maduros. Me inclino a explicar también en este sentido la pregunta de Kosswig cuando, refiriéndose a haber obtenido Bellamy en el pez vivíparo *Xiphophorus*, en tres partos, las razones sexuales: 8 ♂♂ : 1 ♀; 0 ♂ : 10 ♀♀; 6 ♂♂ : 0 ♀, dice: «Sollte die beinahe Eingeschlechtlichkeit der Würfe mit dem Reifezustand des *Xiphophorus* Weibchens zur Zeit der Befruchtung zusammenhängen?». Para resolver esta cuestión hemos hecho tres experimentos, uno con huevos de dos ♀♀ *taen* y cada uno de los otros dos con huevos de una sola ♀ *taen*. Se cortó cada oviducto transversalmente cerca de la mitad y, aisladamente, se fecundaron los huevos de cada una de las mitades y se criaron las larvas hasta la metamorfosis. El resultado fué el siguiente: de los huevos del trozo más próximo a la cloaca se obtuvieron 11 ♀♀ y 14 ♂♂ y del trozo más próximo a la trompa 11 ♀♀ y 15 ♂♂. Estas cifras prueban suficientemente que no hay predisposición sexual de los huevos a base de grados distintos de madurez, según su situación en el oviducto.

CONCLUSIONES

Resumiendo ahora los resultados, el más interesante de la investigación me parece el fenómeno de la desviación de la relación numérica entre los sexos, y esto autoriza a considerar los demás sólo en tanto en cuanto nos faciliten una respuesta a la siguiente cuestión, importantísima por su relación con el problema de la herencia del sexo: ¿cuáles son las condiciones genéticas que dan origen a la desviación de la relación numérica entre los sexos?

El primer hecho notable nos lo ofrece la comparación entre las medidas de los individuos de especie pura criados en la naturaleza y las de los criados en el laboratorio: no obstante las diferencias considerables que existen entre los dos grupos de animales en cuanto a la longitud del cuerpo y a la longitud de las gonadas, éstas alcanzan en ambos igual grado de desarrollo; además en ellos la proporción sexual es, aproximadamente, como 1 : 1. No se puede, por tanto, admitir que la alimentación monótona del laboratorio influya en el grado de desarrollo de las gonadas.

Por lo que toca a la proporción sexual, las dos combinaciones entre las especies *taen* y *palm* se comportan normalmente [1]. Respecto al grado de perfección de las gonadas, dichas combinaciones híbridas *(taenpalm* y *palmtaen)* alcanzan en gran parte un grado inferior al de los individuos puros *taen,* que corresponde, sin embargo, al de los animales de especie pura *palm* criados en laboratorio. Por analogía con el comportamiento de los individuos *taen* de libertad y cautividad, supongo que corresponde también el grado de desarrollo de las gonadas de los individuos *palm* criados en el laboratorio al de los individuos *palm* de la naturaleza, de modo que se puede admitir también la normalidad en el comportamiento de sus respectivos híbridos.

Las combinaciones entre *marm* y *crist,* según experimentos de otros autores, deberían mostrar la misma proporción sexual, es decir, como 1 : 1; las combinaciones entre *bosc* y *palm* (¿y *taen*?) darán probablemente la misma proporción.

[1] Señalemos otra vez la gran semejanza en cuanto al comportamiento biológico de estas dos especies: la posibilidad de sustituir la una por la otra alcanza tal grado que, como dice Baltzer (1930), tratando de la «facultad de desarrollo escalonado» (abgestufte Entwicklungsfähigkeit) de merogonios de especie extraña, los merogonios de *taen* con la esperma de *palm* se desarrollan casi tan perfectamente como con la de la propia especie.

En las demás combinaciones estudiadas faltan casi por completo los machos; en los casos en los cuales no se han presentado, hasta ahora, en absoluto, pueden esperarse todavía algunos individuos repitiendo los experimentos. Hasta hoy estos machos excepcionales sólo se han hallado en ciertas combinaciones en las que algunos individuos—ya sean de estos mismos machos o de sus hermanas (por lo menos de padre) de la misma cría, o de unos y otros a la vez—muestran también extremidades posteriores defectuosas.

Aparte de estos pocos casos en que se observan testículos, en la mayor parte de las combinaciones con desviación de la relación numérica entre los sexos se encuentran gonadas anómalas en pequeño número, que se hallan también, sin embargo, en número todavía más reducido en combinaciones con relación sexual normal tanto puras como híbridas. Se trata, primero, de gonadas indiferentes; en segundo lugar, de constitución distinta de las dos gonadas de un mismo indidivuo (en lo que se considera, como indicio más importante, la existencia de luz), y tercero, de gonadas con «enclavado», es decir, hipertrofia multicelular capsulada, que forma un saliente en la luz rebasando el límite del tejido (¿ampolla testicular?); en este último caso, sin embargo, no se puede pronunciar un juicio determinado sobre la naturaleza de estas células, porque falta un criterio distintivo histológico en el estado de formación gonocitaria.

A base del examen de algunos individuos híbridos de más edad, se puede conjeturar que en adelante quede invariable la relación numérica entre los sexos y que una parte, por lo menos, de las hembras produzca en el año siguiente huevos maduros y capaces de ser *fecundados*, cuya capacidad de *desarrollo*, sin embargo, es muy dudosa, según los experimentos de otros autores.

No se ha podido comprobar ninguna influencia de la madurez de los huevos sobre la tendencia sexual de los animales, al menos en el estrecho margen de los experimentos llevados a cabo.

Finalmente, hay que tener en consideración los datos sobre el desarrollo de los huevos de especie pura y de cruzamiento. El número de gérmenes desarrollados de los huevos de especie pura no alcanza ni con mucho el máximo (100 %); sin embargo, es todavía mucho más bajo en la fecundación híbrida: no llega nunca al 50 %, y desciende en la mayor parte de los casos por debajo del 30 %. Este déficit en los gérmenes frente al tanto por ciento de desarrollo de gérmenes de especie pura, fecundados artificialmente, se hace visible en una fase muy temprana. Aun cuando en este trabajo, por lo general, ha sido considerada la neurulación como «punto de referencia» del desarro-

lo, unos experimentos muy exactos en el estado de primera segmentación y en el de mórula han probado que, salvo pocas excepciones, terminan su desarrollo embrionario y siguen como larvas todos aquellos gérmenes que hayan experimentado la primera segmentación en tiempo y de modo normales. Durante el período larval y hasta después de la metamorfosis las pérdidas son escasas, regulares e idénticas en las especies puras y en las combinaciones híbridas.

¿Cómo se explica el déficit de machos? En los últimos veinticinco años se han analizado ya muchos casos de alteración de la relación numérica entre los sexos originados por causas naturales (patológicas y fisiológicas) o experimentales, como las de nuestro trabajo, cuyo resumen creo oportuno presentar antes de atreverme a incorporar los hechos de mis investigaciones a los conocimientos anteriores.

Las interpretaciones que se dan a la desviación de la razón sexual son fundamentalmente dos: cambio de sexo y letalidad de un sexo (el heterocigótico). Al primer grupo pertenecen todos aquellos casos de intersexualidad de los más distintos orígenes, cuyo carácter común consiste en que se produce la conversión de un sexo en otro por potencias inversas al sexo de partida (sexo genético), existentes en el cuerpo mismo (intersexualidad cigótica de los insectos, intersexualidad hormonal de los vertebrados) o introducidas después (injerto de gonada, parabiosis, anastomosis de vasos sanguíneos embrionarios). Los casos de anomalía de sexo investigados y expuestos por los distintos autores han hallado una interpretación común por la teoría desarrollada por Goldschmidt (1920) sobre «la proporción entre las intensidades de acción o valores de los genes F y M», es decir, de los factores de masculinidad y femineidad.

Cambios en la relación entre los dos factores sexuales pueden ocurrir como consecuencia de hibridación, y se explican suponiendo una dosificación distinta de estos factores en las distintas razas, especies o géneros usados en los diferentes cruzamientos, aun cuando los factores fuesen acordes entre sí en cada uno de dichos grupos. Así ocurre en la intersexualidad diploide (de composición normal de cromosomas) que analizó Goldschmidt (1911-1934 [1]) en cruzamientos entre razas de *Lymantria dispar,* y en la intersexualidad triploide (de composición anómala de cromosomas) examinado en cruzamientos interespecíficos de *Saturnia* por Goldschmdit y Pariser (1923) y Pariser (1927).

En los anfibios se conoce ya una forma de intersexualidad que no es resultado de hibridación; su investigación la debemos a Witschi (1929),

[1] Su obra *Lymantria* (1934) es una extensa exposición de conjunto de todos estos trabajos.

que en ciertas razas locales de ranas encontró en los animales jóvenes una preponderancia notable de un sexo que con el transcurso del tiempo va disminuyendo hasta llegar a la relación numérica normal. Consiguió probar que en estas razas «no diferenciadas» los machos genéticos pasan por una fase femenina antes de terminar su desarrollo según su sexo genético. La explicación de este fenómeno (intersexualidad «transitoria)» dada por Witschi difiere poco de la de Goldschmidt: supone Witschi que los factores de femineidad, que sitúa en los heterocromosomas de los espermatozoides, determinantes del sexo, poseen valores desiguales en las diferentes razas con respecto a los factores invariables de masculinidad, que sitúa en los autosomas, y que esta relación da origen a que las substancias determinantes del sexo («geschlechtsdeterminierende Stoffe)» —como dice Goldschmidt—alcancen la capacidad de reaccionar con velocidad distinta. De modo que también aquí la condición cuantitativa de los factores sexuales decide la formación del sexo.

Es diferente el caso en los híbridos intergenéricos de *Xiphophorus helleri* y *Platypoecilus maculatus* (teleósteos), que Kosswig viene estudiando desde 1928. En *Platypoecilus* se comprueba que el sexo está fijado genéticamente y que las hembras son heterocigóticas; en *Xiphophorus*, por el contrario, de su comportamiento hereditario se deduce que no existen en él heterocromosomas; su determinación se verifica, por tanto, fenotípicamente. Hay que considerar este pez como hermafrodita protogino, en el que influencias exteriores de ambiente pueden producir efecto sobre el sexo. En el cruzamiento de estas dos especies, tan profundamente diferentes en cuanto a su determinación del sexo, resultan desviaciones en ambos sentidos en la relación numérica normal entre los sexos; desviaciones que ofrecen interés especial, dado que genes de color obran como realizadores de sexo. Kosswig, tratando de este caso tan singular, supone que se deben juzgar los pigmentos como «grados distintos de oxidación de un cromógeno en dirección a la melanina», y que se puede establecer una correspondencia entre esto y el metabolismo de oxidación diferente en cada sexo.

La segunda posibilidad de explicación de la falta de individuos de un sexo consiste en admitir la letalidad—o subletalidad—del sexo heterogamético.

King (1911, *a*, *b*), investigando la determinación del sexo en diferentes animales [anfibios *(Bufo)* e híbridos de ratones], encontró desviaciones de la proporción sexual normal y las consideró como resultado de una producción aumentada de un sexo («It appears that hybridizing alters the sex ratio by producing a marked increase in the relative propor-

tion of males»), y la analiza según los conocimientos de entonces acerca de la determinación del sexo, a base de la hipótesis de una fecundación selectiva. En los anfibios—no se trataba de experimentos de hibridación, sino de estudios sobre la influencia de condiciones externas antes o en el momento de la fecundación—discute la posibilidad, correspondiente a los experimentos de supermadurez de R. Hertwig, de que el metabolismo de la célula huevo (el contenido de agua) pueda haber influído en el sexo.

En tiempos más recientes se describieron muchos casos de desviación de la razón sexual en cruzamientos de aves; así, en los híbridos de palomas (Cole, Painter, Zeimet, 1928-1929) y en los de faisanes (Haig Thomas y Huxley, 1927) se observó una preponderancia numérica de machos. Cole, Painter y Zeimet hacen resaltar que los híbridos de palomas ya crecidos son todos machos genéticos (y no individuos hembras por su constitución genética que se hayan vuelto fenotípicamente machos por un cambio de sexo) y que positivamente las hembras murieron todas en estados embrionarios muy tempranos. Sin embargo, Haig Thomas y Huxley, en los cruzamientos de faisanes, encuentran que a pesar de la mortalidad grande de machos jóvenes, la proporción en los animales crecidos es todavía como 1 : 1, y en vista de ello emiten una opinión diferente sobre el problema. El hecho de que frecuentemente la combinación recíproca muestre una proporción sexual normal sin mortalidad previa de animales jóvenes, contribuye a que estos últimos autores expliquen sus resultados como lo ha hecho Goldschmidt en sus investigaciones de *Lymantria:* potencias distintas de los determinantes del sexo, llevadas por las distintas categorías zoológicas (raza o especie) que entran en el cruzamiento, han de ocasionar también en este caso el cambio de sexo y la mortalidad mayor de los machos jóvenes, la cual ha de tener su fundamento en la debilitación constitucional de los machos por ser genéticamente hembras. Además citan los resultados de cruzamiento conseguidos por otros varios autores que, calculando la razón sexual, obtenían, a pesar del cambio de sexo, el resultado inesperado de 1 : 1, por no haber prestado atención a la pérdida de machos por mortalidad de los animales en estados tempranos de desarrollo, que compensa la disminución de hembras debida a aquel cambio.

En los dos últimos casos (el de las palomas y el de los faisanes) son las hembras las que faltan o se presentan en número muy reducido; hecho que hace recordar la regla establecida por Haldane (1922): «When in the F_1 offspring of two different races one sex is absent, rare, or sterile, that sex is the heterozygous sex», y esto vale también para los casos mencionados, pues es sabido que en las aves el sexo femenino es el he-

terogamético. Haldane supone que este hecho se explica por una perturbación del mecanismo cromosomático, que ocurre en un modo más intenso cuando se trata de la combinación heterocigótica. Evidentemente, en esta regla siguen quedando incluídas aquellas dos causas: el cambio fenotípico de los individuos del sexo heterocigótico al sexo contrario, o la mortandad de los individuos del sexo heterocigótico. Así, Federley (1929), a base de estudios en lepidópteros, en que también en ciertas combinaciones híbridas falta por completo o casi totalmente un sexo, el heterocigótico (también las hembas), dedujo que al realizarse el cambio de hembras en machos resultarán los últimos en el 100 % de los huevos; mas si han muerto las hembras, «dann müssten nur 50 % der Eier Männchen ergeben, die übrigen 50 % früher oder später zu Grunde gehen und die Leichen der Weibchen nachgewiesen werden können». En efecto, dicho autor encontró en ciertas combinaciones de esfíngidos que las orugas que, por su constitución genética, habían de ser hembras, morían, a consecuencia de una combinación cromosomática «subletal», antes de lograr la metamorfosis, y de este modo, por el número de cadáveres, se podía calcular con exactitud el porcentaje de los individuos con vitalidad reducida.

Pasemos ahora a los resultados del presente trabajo. Considerando los hechos expuestos, ¿se puede tratar de intersexualidad en el sentido de Goldschmidt? Es decir, ¿tenemos derecho a suponer que los determinantes del sexo de las diversas especies empleadas para los distintos cruzamientos se forman en cantidades diferentes, de modo que se pueda hablar de especies «fuertes» y «débiles» análogamente a como se habla en *Lymantria* de razas fuertes y débiles? A primera vista se reconoce que con las especies estudiadas de *Triton*, según den una razón sexual normal o anómala en sus cruzamientos, se pueden formar ciertos grupos biológicos, que corresponden con grupos geográficos (Álvarez López, 1934) y muestran cierto paralelismo filogenético. El primer grupo se compone de *marm* y *crist;* el segundo, de *taen, palm* y *bosc;* «en cuanto a *Molge alpestris*—dice Álvarez López—, ligaría las dos secciones entre sí, ya que por un lado se aproxima a *Molge marmorata* (por el cráneo y la cresta dorsal entera) y por otro a los de la segunda serie». Por mera analogía, y procediendo arbitrariamente, designaré el grupo *taen* como de especies «débiles»; el grupo *marm*, como de «fuertes», y *alp*, como intermedio, ya que éste no forma híbridos en proporción sexual normal ni con un grupo ni con el otro. En caso de que esté justificado en *Triton* el hablar de especies de distinta fuerza, experimentos de cruzamiento, que se pueden llevar a cabo en ambas direcciones, tendrían que aclarar la cuestión

de si la determinación del sexo se verifica como en *Lymantria,* y por esta razón pasaremos a considerar los cruzamientos entre *taen* y *alp,* y no no los éntre *taen* y *crist,* especies quizás todavía más apartadas, pues, como ya hemos visto, los últimos sólo en una dirección proporcionan resultados útiles.

Hasta ahora no se sabe qué sexo es el heterocigótico en *Triton;* para facilitar la discusión que sigue supondremos que es el masculino (tipo *Drosophila*) por analogía con *Rana,* en la que Witschi, por el procedimiento genético, ha demostrado que así ocurre. Si las condiciones genéticas en *Triton* fuesen iguales a las de *Lymantria,* salvo que en ésta el sexo heterocigótico es el femenino (tipo *Abraxas*), aunque hasta ahora no se conocen en *Triton* datos para sacar conclusiones en cuanto al modo de la herencia de los factores sexuales, tendríamos que esperar a que el factor de la femineidad, F, sea transmitido en *Triton* por el heterocromosoma; por tanto, la hembra tendría dos dosis de F y el macho nada más que una. Ahora, continuando con la interpretación de Goldschmidt, tropezamos con una dificultad en la herencia del factor de la masculinidad, M, en *Triton:* dicho autor admite que el factor de femineidad en *Lymantria* se transmite sólo por medio de la madre, lo que expresa en sus fórmulas: $\boxed{F}MM = ♂$ y $\boxed{F}M = ♀$; pero esta suposición no tiene fundamento para el factor M en el género *Triton.* Consideremos, pues, el caso de valor más amplio, que se verifica en el tipo *Drosophila* y que admite que el factor de masculinidad, M, se propague por los autosomas en doble dosis; su fórmula es: MM FF = ♀; MM Ff = ♂. En este caso —razonando según la teoría de Goldschmidt de distinta fuerza de los factores—, la F_1 de un cruzamiento entre una especie «fuerte» o «intermedia» y otra «débil» tiene que consistir, en una dirección, en 50 % de hijas normales y 50 % de hijos anómalos (intersexuales), mientras que en la dirección recíproca todos los animales de la F_1 deben ser normales.

Por analogía con el esquema de Goldschmidt (1931, pág. 80), y admitiendo su modo de cálculo en cuanto a la realización de los grados de intersexualidad, al ser la diferencia entre los valores opuestos de los factores sexuales F y M inferior al mínimum epistático, se tendría que esperar en los tritones una situación genética como la indicada en el siguiente esquema:

Tritón *alpestris,* especie «intermedia»:

♀ = M_a (50) M_a (50) F_a (80) F_a (80); ♂ = M_a (50) M_a (50) F_a (80) f (0)

Tritón *taeniatus,* especie «débil»:

♀ = M_t (30) M_t (30) F_t (40) F_t (40); ♂ = M_t (30) M_t (30) F_t (40) f (0)

De este modo resulta FF > MM > F, y la diferencia de los valores sexuales en cada combinación normal dentro de la misma especie es superior al mínimum epistático (= 20).

Las dos combinaciones híbridas posibles en F habrían de ser:

I. ♀ «débil» × ♂ «intermedio»:

$$F\begin{cases} \text{Mt (30) Mt (30) Ft (40) Ft (40)} \times \text{Ma (50) Ma (50) Fa (80) f (0)} \\ 1/2\text{: Mt (30) Ma (50) Ft (40) Fa (80)} = ♀♀, \text{ pues FF} - \text{MM} > 20 \\ 1/2\text{: Mt (30) Ma (50) Ft (40) f (0)} = ♂♂, \text{ pues MM} - \text{Ff} > 20 \end{cases}$$

II. ♀ «intermedia» × ♂ «débil»:

$$F\begin{cases} \text{Ma (50) Ma (50) Fa (80) Fa (80)} \times \text{Mt (30) Mt (30) Ft (40) f (0)} \\ 1/2\text{: Ma (50) Mt (30) Fa (80) Ft (40)} = ♀♀, \text{ pues FF} - \text{MM} > 20 \\ 1/2\text{: Ma (50) Mt (30) Fa (80) f (0)} \approx ♂♂ \text{ intersex., pues MM} - \text{Ff} = 0\,!! \end{cases}$$

Según este cálculo, los machos, como hemos dicho más arriba, deberían resultar anómalos en una combinación y todos normales en su recíproca. Mas en los cruces de *Triton* observamos un fenómeno completamente diferente: los machos faltan por completo, o casi por completo, tanto en la combinación *alptaen* como en su recíproca, y lo mismo ocurre en todas las demás combinaciones que presentan desviación en la razón sexual, hasta el extremo de que, en total, sólo se han encontrado seis individuos con testículos.

Si consideramos la conformación de las gonadas femeninas, llama la atención el gran número con desarrollo muy inferior a lo normal, y se podría sospechar que tales gonadas fuesen de individuos genéticamente masculinos, pero cambiados por intersexualidad. Sin embargo, el porcentaje de individuos que demuestran este menor desarrollo resulta tan elevado (93,15 $^0/_0$ del total de los individuos «hembras» originados por cruzamientos con desviación de la razón sexual) que la siguiente reflexión, a base del cálculo llevado a cabo, contradice toda posibilidad: como sólo la mitad de los individuos deben ser machos genéticos y el cambio de sexo no puede efectuarse sino en éstos, es decir, en 50 $^0/_0$ de los animales obtenidos, el escaso desarrollo de las gonadas no se puede tomar como indicio de tal cambio.

Gonadas calificadas de «anómalas» (con formación diferente de su luz, con «enclavado», etc.) se hallaron en estos cruzamientos en número pequeñísimo y sin distinción, en cuanto al porcentaje, en las combinaciones

recíprocas; podría ser que un material mucho mayor proporcionase otros resultados.

Wɪtschi, en sus investigaciones sobre las razas de *Rana* sexualmente «diferenciadas» y «no diferenciadas», admite una distribución semejante de los factores sexuales en los cromosomas, situando MM en las autosomas, y FF o Ff, según el animal sea hembra o macho, en los heterocromosomas. Como en sus experimentos el grado de diferenciación parece distinto en cada raza, deduce que la relación entre los valores de la feminidad y de la masculinidad varía en cada una, lo que se produce por medio de valores variables de F y de f (que en su caso tiene también valores determinados), mientras que el valor de M es el mismo en todas las razas. Así resulta una serie de valores desde $F = f = M$ (caso de la raza no diferenciada) hasta $FF > MM > Ff$ (caso de la raza diferenciada, que es el normal en la heterogamecia masculina). No cabe duda que esta explicación no es aplicable a *Triton,* cuyas especies han resultado todas sexualmente bien diferenciadas.

Por lo expuesto vemos que todavía no hay argumentos en favor de que la intersexualidad fundada en los distintos grados de intensidad y de las diferentes especies sea la causa de la desviación de la razón sexual en los tritones. Antes de discutir una posible letalidad del sexo heterogamético tenemos que comparar brevemente nuestros resultados con los que obtuvo Kosswig en híbridos de peces: creo que basta señalar la estabilidad de la razón sexual normal en las formas puras de los *Triton* y los resultados negativos de los experimentos sobre la madurez de los huevos de estos anfibios para demostrar que la determinación del sexo en ellos se realiza de modo rigurosamente genotípico y que, por consiguiente, no se puede establecer paralelismo con la determinación de la sexualidad en aquellos híbridos de peces.

En cuanto a la letalidad, tuvimos ocasión de diagnosticar un déficit muy alto de desarrollo en la primera fase de segmentación del huevo, que es aún mucho mayor en los híbridos que en los animales de forma pura fecundados artificialmente (con excepción de *crist);* después las pérdidas son pocas y semejantes en todas las combinaciones, sean puras o híbridas. Podría inclinarse uno a pensar en la mortalidad de los gérmenes machos—mejor dicho, en los huevos fecundados por un espermatozoide que lleva la determinación masculina—porque la combinación cromosomática determinante del sexo masculino hubiera de vencer resistencias más fuertes en el plasma del huevo de especie ajena. Sin embargo, dos argumentos de mucha importancia contradicen tal explicación: primero, la pérdida en las dos combinaciones de *taen* y *palm,* únicas com-

binaciones híbridas que se criaron en proporción sexual normal, resulta al principio del desarrollo tan alta, por lo menos, como en las demás combinaciones con desviación de dicha relación, y en segundo lugar, el tanto por ciento de desarrollo de las formas puras obtenidas por fecundación artificial no alcanza, ni con mucho, el doble del número de los híbridos, lo que hay que esperar necesariamente, según Federley, en el caso de la letalidad del sexo heterogamético: entre los valores óptimos de *taentaen* y *taencrist* no hay más que una diferencia de 20 %, aproximadamente, que, aun teniendo en cuenta todas las posibilidades de error resultantes de la práctica, no es suficiente para justificar la suposición de que hayan sido eliminados la mitad de los individuos, es decir, los machos genéticos, en la fecundación misma o antes de la primera segmentación.

No obstante, en relación con esto merecen mencionarse nuevamente las deformidades de las extremidades posteriores y los demás defectos, que afectan en gran número, como llevamos expuesto en el lugar correspondiente, justamente a los pocos machos que existen y muchas veces también a los individuos hermanos de la misma cría con gonadas femeninas de grado inferior de desarrollo, es decir, sin haber formado oocitos. Estos defectos permiten concluir que la formación constitucional total de estos pocos machos genéticos es defectuosa, lo que está de acuerdo con las experiencias de Federley en los cruzamientos de lepidópteros (¿a base de una combinación cromosomática subletal?). Por otra parte, la aparición de iguales defectos en individuos con gonadas femeninas, por tanto hembras, precisamente en los mismos cultivos o, por lo menos, dentro de la misma combinación híbrida—hay que recordar que dichos defectos sólo ocurrieron, de un modo llamativo, en combinaciones híbridas con desviación de la razón sexual—da la impresión, a pesar de todo, de que tales individuos sean también machos genéticos que hayan experimentado fenotípicamente un cambio sexual. También en este caso se podría aducir como causa una «combinación cromática desarmónica» (Federley); pero creo que con esta explicación aun no se dilucida nada concretamente acerca del conjunto genético que ocasione la desviación de la relación sexual.

Hasta el presente me he de limitar a las indicaciones hechas en este trabajo, que señalan las direcciones en que hay que buscar, o no, la solución del problema que plantea la relación numérica entre los sexos en los híbridos interespecíficos del género *Triton*. Como, para aclarar la cuestión, hay poca esperanza de criar una generación F_2 o, a lo menos, la generación de $F_1 \times P$, las investigaciones, en mi opinión, sólo han

de encaminarse en dos direcciones, con sus respectivos métodos: primera, la investigación citológica del sexo heterogamético y la del proceso de fecundación en el huevo; segunda, el obtener nuevamente, en gran escala, en sus dos sentidos una combinación híbrida con desviación de la razón sexual (como *taenalp* y *alptaen*, por ejemplo) que prometa llevar a cabo con mucho éxito el análisis de las anomalías, hasta ahora poco frecuentes, que se presenten en las gonadas.

ZUSAMMENFASSUNG

Nachdem bei einigen durch künstliche Befruchtung erhaltenen Speziskreuzungen von *Triton* ein erheblicher Männchenausfall aufgetreten war, bezweckte diese Untersuchung, den Umfang der Geschlechtsverschiebung und die näheren Umstände festzustellen, unter denen sie bei den verschiedenen Kombinationen vorkommt.

Die künstliche Befruchtung wurde nach der Methode von O. Hertwig ausgeführt (pp. 15-17).

Aus der Aufzucht der Larven (pp. 17-22) erwähne ich, dass als Futter die Darreichung von *Enchytraeus* der von *Cyclops* vorgezogen wurde, da letztere häufig die jungen Tritonlarven auffressen.

Nomenklatorisch ist zu bemerken, dass, abweichend von den beiden ersten Veröffentlichungen (1932-1933) der kleine Teichmolch mit *Triton taeniatus* statt mit *T. vulgaris* bezeichnet wird; in den Kombinationen wird stets das Weibchen an erster Stelle genannt, und zur Vereinfachung der Ausdrucksweise werden für die Namen der reinen Arten und der Bastarde Abkürzungen eingeführt (z. B. *taennalp* = Bastard *Triton taeniatus* ♀ × *T. alpestris* ♂; *alptaen* = reziproke Kombination). Die durch künstliche Befruchtung entstandene Stammform *T. palmatus* ♀ × *T. palmatus* ♂ wird *palmpalm* genannt, etc.

Von den 16 möglichen Kombinationen zwischen den 4 deutschen Arten *taen, palm, alp* und *crist* wurden 13 durch künstliche Befruchtung zur Entwicklung gebracht und aufgezogen; es fehlen nur die 3 Kreuzungen, bei denen *crist* die Eier liefert. Die Schwierigkeit, *crist*-Eier künstlich zu befruchten, ist schon manchem Forscher (Hamburger, Poll) bei dem Versuch der Kreuzbefruchtung aufgefallen; den Grund glaubt Hamburger darin zu sehen, dass sich grosse Eier (*crist*) schlecht mit kleinem Samen befruchten lassen. Da ich aber auch bei künstlicher Befruchtung von *crist*-Eiern mit *crist*-Samen eine auffallend niedrige Entwicklungs-

quote bekam, bestätigt meine Erfahrung eher diejenige von O. Hertwig (1893), dass die *crist*-Eier an und für sich empfindlicher gegen Verletzungen sind als die Eier der übrigen *Triton*arten.

Auf die Morphologie der Bastarde wird in dieser Arbeit nicht eingegangen; es wird lediglich für die Zwecke der Untersuchung darauf hingewiesen, dass, mit Ausnahme der Kombinationen zwischen *taen* und *palm*, die Bastarde in Färbung und Grösse väterlich beeinflusst sind, und dass deshalb zur Zeit der Metamorphose ihre Bastardnatur mit Sicherheit festgestellt werden konnte (Fig. 3-16, pp. 24, 26-28).

Tabelle I p. 29 gibt eine Uebersicht über die Zahl der Eier (Spalte 2), die im Laufe von 3 Jahren in Berlin [1] künstlich besamt worden sind, und über die jeweils daraus hervorgegangenen Keime (Spalte 3, 4), resp. Larven (Spalte 5, 6), resp. «Jungtiere» (kurz nach der Metamorphose; Spalte 7, 8) als absolute Zahl und in Prozenten der unmittelbar vorhergehenden Entwicklungsstufe.

Als Stichpunkt der Entwicklung habe ich die Neurulation genommen, weil es sich erwies, dass die Morulabildung (16-20 Stunden nach der künstlichen Befruchtung) sehr häufig auf Grund der undurchsichtigen äusseren Eihülle («Klebschicht», Spemann, 1901) übersehen wurde. Da die Phase der Neurulation aber schon eine relativ vorgeschrittene Embryonalentwicklung anzeigt, wäre es vollkommen unberechtigt, den Entwicklungsbeginn aus ihr ohne weiteres ablesen zu wollen; aber aus einigen ganz exakten Feststellungen der 1. Furchung und der Morulabildung bei 61 Eiern *taentaen* und 62 Eiern *taencrist* (Tabelle II, p. 31) geht hervor, dass in praxi bei *Triton* alle die Eier, die nach künstlicher Befruchtung mit arteignem oder artfremdem Samen die 1. Furchung zu normaler Zeit (nach 5 Stunden) und in normaler Weise durchgemacht haben, in ihrer Entwicklung fortfahren und sie beenden. Die Neurulation konnte deshalb als Stichpunkt des Entwicklungsbeginns gelten.

Bei Betrachtung der Prozentzahlen (Spalte 4) der Entwicklung der durch künstliche Befruchtung entstandenen reinen Arten fällt zunächst auf, dass diese Zahlen noch weit von dem Maximum entfernt bleiben; die Annahme scheint berechtigt, dass sich auch in der Natur nicht 100 % der Eier entwickeln. Die entsprechenden Zahlen für die Entwicklung der Bastarde liegt ganz erheblich niedriger. Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung und des Larvenlebens übersteigen die Verluste — abgesehen von einigen meist durch Versuchsfehler bedingten Ausnahmen —

[1] Leider waren die Versuchsbedingungen in Madrid nicht so glücklich wie in Berlin; die Resultate sind spärlich ausgefallen und konnten deshalb bei den meisten statistischen Berechnungen nicht verwertet werden.

in keiner Kombination (weder der reinen Arten noch der Bastardkombinationen) 30 %.

Die Länge der Embryonalentwicklung ist weitgehend abhängig von der Temperatur, sie schwankt zwischen 11 und 20 Tagen. Die Länge der Larvenperiode hingegen scheint von der Temperatur wesentlich unabhängiger zu sein; die Zuchtperiode erstreckte sich stets von April bis September, und die Entwicklungslänge der zuerst und der zuletzt im Laboratorium geschlüpften Tiere (der Unterschied betrug genau 1 Monat) ist fast gleich. Tabelle III (p. 36) und die graphischen Darstellungen fig. 17, 18, 19 (pp. 37-39) beschäftigen sich mit der Länge der Larvenperiode. *Palmpalm* und *taentaen* verhalten sich in dieser Hinsicht sehr ähnlich, sie brauchen im Mittel ca. 70 Tage, *alpalp* braucht 7 Tage weniger, *cristcrist* 18 Tage mehr. Die beiden Kombinationen zwischen *taen* und *palm* brauchen im Mittel 10 bz. 17 Tage weniger als ihre Stammarten (Heterosis ?); die Bastardkombinationen, die aus *alp*-Eiern hervorgehen, entwickeln sich wesentlich rascher als ihre Reziproken; auch *alpcrist* entwickelt sich auffallend rasch; *alp* als mütterliche Art verkürzt stets die Dauer der Larvenperiode.

Es wird auf einige Bastardeigentümlichkeiten aufmerksam gemacht (pp. 38-40); so wie Glücksohn in der zeitlichen Ausbildung der Extremitäten der reinen Arten *taen* und *crist* einen erheblichen Unterschied nachgewiesen hat, so lässt das Verhalten der Bastarde zwischen *taen* und *crist* und zwischen *bosc* und *marm* vermuten, dass bei diesen Bastarden die Extremitätenausbildung sehr stark von der väterlichen Spezies beeinflusst wird.

Die Länge metamorphosierter Tiere interessiert um so mehr, als die Laboratoriumsernährung einen schädlichen Einfluss auf die Gesamtentwicklung der Individuen, im besonderen aber auf die Gonaden ausüben könnte, der sich natürlich bei den in der Gefangenschaft aufgewachsenen Tieren der reinen Arten genau so bemerkbar machen müsste wie bei den Bastarden. Ausserdem könnte nach Auffassung von Klatt eine Relation zwischen der Körperlänge und der Länge der Larvenperiode bestehen. Tabelle IV (p. 41), fig. 20 (p. 43; Mittelwerte) und Tafel I, fig. 1-4 zeigen, dass der Wert für die in der Freiheit aufgewachsenen Individuen *taen* tatsächlich um 8 mm. höher liegt, und dass sich die Werte für die Länge der Bastarde intermediär zu denen der Eltern-Stammarten verhalten, und zwar derart, dass die mütterliche Art einen stärkeren Einfluss auf die Grösse ausübt. Im allgemeinen kann man sagen, dass *alp* und *crist* einen wachstumsfördernden Einfluss haben, *palm* dagegen eine «wachstumshemmende» Komponente bildet. Der Vergleich mit Ta-

belle III (Dauer der Larvenperiode) zeigt, dass die Tatsachen dafür sprechen, dass Körperlänge und Entwicklungsdauer von einander weitgehend unabhängige, erbliche Grössen sind.

Der nächste Abschnitt befasst sich mit der Untersuchung der Gonaden und daran anschliessend mit der zahlenmässigen Verteilung der Geschlechter. Obgleich, wie bekannt, die geschlechtliche Differenzierung der Keimdrüsen auf einem frühen Larvenstadium vor sich geht, bleibt die Diagnose bis zu der Phase der Spermatocyten- und Ovocytenbildung auf ein ziemlich rohes anatomisches Unterscheidungsmerkmal angewiesen: auf das Vorhandensein eines Lumens in der weiblichen Geschlechtsdrüse, das in der männlichen fehlt. Zur Zeit der Metamorphose trifft man die Hoden für gewöhnlich auf dem Stadium der Spermatogoniengenerationen, die Eierstöcke dagegen schon angefüllt mit Ovocyten. Aus Tabelle V (pp. 46-47) geht als erste wichtige Tatsache hervor, dass die Gonaden der in der Gefangenschaft aufgewachsenen, natürlich und künstlich besamten Tiere der Stammform *taen* gleiche Entwicklungshöhe erreicht haben wie die in der Natur aufgewachsenen, und dies trotz geringerer Körperlänge. Man ist also zu der Behauptung berechtigt, dass die besonderen Verhältnisse der Aufzucht in der Gefangenschaft auf die Entwicklungshöhe der Gonaden keinen Einfluss ausüben; allerdings lässt Tabelle VI (pp. 52-53) erkennen, dass sich die Gonaden der in der Natur und der Gefangenschaft aufgewachsenen Tiere erheblich in den Massen unterscheiden.

Die Eierstöcke der in der Gefangenschaft aufgewachsenen Stammformen *alpalp* und *palmpalm* haben nicht durchweg dieselbe Entwicklungshöhe erreicht [1]; es wird die Vermutung ausgesprochen, dass dies Verhalten seine Parallele—analog den *taen*-Tieren—bei den in der Natur aufwachsenden Individuen der gleichen Art hat, und dass in der niedrigeren Temperatur der Mittelgebirgsgewässer, in denen *palm* und *alp* heimisch sind, die Ursache zu suchen ist. Weiter geht aus der Tabelle V hervor, dass alle Stammformen, soweit die Zahlen gross genug sind, ein Geschlechtsverhältnis von annähernd 50 % ♀♀ zu 50 % ♂♂ ergeben. Dasselbe Resultat geben die beiden Kombinationen der Kreuzungen zwischen *taen* und *palm;* die weiblichen Gonaden stehen in der Mehrzahl

[1] Zur Unterscheidung der vorgefundenen Entwicklungsstufen sind willkürlich 3 Klassen gebildet worden: 1. Eierstöcke angefüllt mit Ovocyten (Spalte 4 ⊙⊙, fig.21); 2. Eierstöcke mit wenig Ovocyten (Spalte 5 ⊙, fig. 22); 3. Eierstöcke ohne Ovocyten, auf dem Stadium der Ovogonienbildung (Spalte 6 ⌒, fig. 23). Bei den Hoden sind 2 Klassen unterschieden : mit Ampullen (Spalte 8 ●, fig. 25) und ohne Ampullen (Spalte 7 ○, fig. 24).

auf der niedrigsten Entwicklungsstufe. Dies ist auch der Fall bei allen folgenden Bastardkombinationen, die nun aber ausserdem an einem auffallenden Mangel an männlichen Individuen leiden; nur insgesamt bei 1,45 % der Individuen wurden Hoden («Ausnahmshoden»; Tabelle VII, Spalte 5) gefunden.

Ausserdem traten aber in den Bastardkombinationen mit Männchenausfall noch eine Reihe Anomalien im histologischen Aufbau der Gonaden auf, wie sie allerdings in ganz geringer Zahl auch bei reinen Arten oder Kombinationen mit normalem Geschlechtsverhältnis gefunden wurden. Abgesehen von einer Verminderung der generativen Zellen, dem Uebergang der Zellschichten in bindegewebige Degeneration in einer typisch weiblichen Gonade (mit gutausgebildetem Lumen), und der noch zu diesem Zeitpunkt vollständigen Undifferenziertheit der Keimdrüsen (fig. 27, p. 58), finden sich unter den Bastardkombinationen mit Geschlechtsverschiebung 11 Fälle (= 2,07 %) gegenüber je einem Fall bei *palmpalm* und bei *palmtaen*, bei denen eine Gonade typisch weiblich, die andere aber ohne Lumen, solide, nach Art der Hoden ausgebildet ist (fig. 28-29; Tabelle VII, Spalte 3); hier macht sich der Mangel an feinen Unterscheidungsmerkmalen zwischen weiblichen und männlichen Geschlechtszellen niedriger Entwicklungsstufe fühlbar: es kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, dass es sich abgesehen von dieser Abweichung vom grob anatomischen Bau der Gonade auch wirklich um die Bildung männlicher Geschlechtszellen handelt.

Eine zweite, noch interessantere Anomalie bilden 6 Fälle von «Einsprengsel» (Tabelle VII, Spalte 4) in den mit Lumen versehenen Gonaden (von denen 1 Fall auf die Stammform *bosc* enttällt): cystenartig abgekapselte, zellenreiche Körper, die ihren Ursprung in der Keimzellschicht der Gonade haben und in das Lumen hineinragen (fig. 30, 31, 32, pp. 62-63). Es liegt die Annahme nahe, dass es sich um Hodenampullen handelt, aber auch in diesem Fall ist ein sicherer Nachweis der männlichen Natur der Zellen nicht möglich.

Schliesslich (Tabelle VII, Spalte 7) gibt ein Vergleich der Resultate dieser Arbeit mit denen der vorigen (1935) über Missbildungen bei den *Triton*bastarden Veranlassung zu der Feststellung, dass sich die Hinterbeinverkrüpplungen nur in denjenigen Kombinationen mit Geschlechtsverschiebung vorfanden, in denen auch die «Ausnahmshoden», vorkamen, zum Teil betreffen sie diese Männchen selbst, zum Teil ihre Kulturgeschwister, zum Teil beide.

Die mir von Herrn Dr. V. Hamburger freundlichst übersandten 6 Bastarde *cristtaen* — also der Kombination, die mir nicht gelungen war—

hatten alle weibliche Gonaden, 5 davon standen auf der niedrigsten Entwicklungsstufe; bei dem sechsten Tier, das erst 1 Jahr nach der Metamorphose getötet worden war, fanden sich im Ovar wenige grosse Ovocyten; im übrigen war dieses Ovarium degeneriert, kollabiert und enthielt keine jüngeren Keimzellgenerationen.

6 von mir aufgezogene Bastarde *taencrist*, die auch noch bis 1 1/2 Jahre nach der Metamorphose am Leben geblieben waren, erwiesen sich sämtlich als Weibchen; 2 von ihnen hatten gut ausgebildete Ovarien voller Ovocyten. Es ist anzunehmen, dass solche Tiere reife Eier liefern würden, aber damit besteht nach Erfahrung von Bataillon und Tchou Su (1932) noch wenig Aussicht, aus ihnen eine neue Generation ziehen zu können.

1931 waren einige Versuche angesetzt worden, durch Ueberreife der Eier das Geschlecht zu beeinflussen; aber entweder ist die Determination in den *Triton*eiern auf diese Weise nicht zu beeinflussen, oder die Dauer der Befruchtungsverzögerung war nicht gross genug (26-48 Stunden), jedenfalls entsprach das Resultat durchaus der für die reine Art (*taentaen*) und für die Bastardkombination (*taencrist*) üblichen Geschlechtsproportion. Ebensowenig konnte aus der Lage der Eier im Eileiter (cranialer oder caudaler Abschnitt) auf irgendeinen Unterschied in Bezug auf die Geschlechtsbestimmung geschlossen werden.

Die theoretische Erörterung stellt die anomale Geschlechtsproportion der meisten Bastardkombinationen als wichtigstes Resultat der Untersuchungen heraus; die übrigen Resultate sind von sekundärem Interesse und werden nur darauf hin betrachtet, inwiefern sie zur Beantwortung der Frage beitragen können: welcher genetischen Konstellation verdankt die Geschlechtsverschiebung bei den *Triton*bastarden ihre Entstehung?

Aehnliche Probleme sind in den letzten 25 Jahren häufig erörtert worden: Verschiebung der Geschlechtsproportion durch Geschlechtsumwandlung oder durch Letalität des heterozygoten Geschlechts sind als die Ursachen solcher Entwicklungsstörungen erkannt worden. Es ist aber noch nicht möglich, den Tatsachenkomplex der Geschlechtsverschiebung bei *Triton* zu erklären. Um Geschlechtsumwandlung auf Grund «starker» und «schwacher» Arten (im Sinne Goldschmidts) kann es sich erstens nicht handeln, weil die Anomalie in der F_1 - Generation in beiden Richtungen auftritt; und zweitens hätte diese Erklärung nur gültig sein können, wenn sich die äusserst niedrige Entwicklung der weiblich ausgebildeten Gonaden zur Zeit der Metamorphose nicht, wie es der Fall ist, bei 93,15 %, sondern nur bei 50 % aller Bastardindivi-

duen hätte nachweisen lassen; denn dies allein hätte dazu berechtigt, diese Individuen als Umwandlungstiere (= genetische Männchen) zu betrachten.

Die Stabilität der Geschlechtsproportion bei den reinen *Triton*arten und die negativen Resultate der «Reifeversuche» sprechen gegen eine Erklärung, die derjenigen von Kosswig bei Fischbastarden analog wäre. Ebensowenig besteht eine Parallele zu Witschis Resultaten, die aus den Untersuchungen differenzierter und undifferenzierter Froschrassen gewonnen wurden; bei *Triton* ist das Stärkeverhältnis des Geschlechtsfaktoren jeder einzelnen Spezies derartig, dass die Geschlechter im normalen Verhältnis 1 : 1 gebildet werden.

Wenn das männliche Geschlecht (das heterozygote ?) bei *Triton* letal oder subletal wäre, so müsste nachgewiesen werden können, das 50 % der Individuen sterben. Der ausserordentlich niedrige Prozentsatz der Eier, die, mit fremdartigem Sperma besamt, sich zu entwickeln beginnen, legt den Gedanken nahe, es könnte sich auch im Falle *Triton* um das Phänomen der Letalität des heterozygoten Geschlechts handeln; aber die Entwicklungsquote der reinen Arten liegt bei weitem nicht doppelt so hoch (zwischen *taentaen* und *taencrist* besteht z. B. nur ein Unterschied von 20 %). Ausserdem spricht gegen diese Annahme, dass auch die beiden einzigen Bastardkombinationen mit normaler Geschlechtsproportion, die zwischen *taen* und *palm*, eine mindestens ebenso niedrige Entwicklungsquote haben. Die Hinterbeinverkrüpplungen gerade der wenigen vorhandenen Männchen lassen auf eine erhebliche Schwächung der Konstitution schliessen; dies stände allerdings im Einklang mit Federleys Erfahrung über Subletalität bei Lepidopterenbastarden (1929), aber die Verkrüpplungen, die gerade häufig bei den Kulturgeschwistern mit weiblichen Gonaden aufgetreten sind, würden sich auf diese Weise nur unter der Annahme erklären lassen, dass diese Individuen Umwandlungsweibchen, also genetische Männchen sind.

Zytologische Untersuchung des Befruchtungsvorganges, Ermittlung des heterozygoten Geschlechts und Spezialisierung der Aufzucht auf zwei unter einander reziproke Kombinationen mit Männchenausfall (wie *taenalp* und *alptaen*) zur genaueren Analyse der Gonadenanomalien könnten zur Aufklärung dieses interessanten Tatsachenkomplexes beitragen.

Institut für Vererbungsforschung, Berlin-Dahlem,
y Laboratorio de Biologia del Museo Nacional
de Ciencias Naturales, Madrid.

Bibliografía.

Abramowicz, H.

1913. Die Entwicklung der Gonadenanlage und Entstehung der Gonocyten bei *Triton taeniatus* (Schneid.). *Morph. Jb.*, xlvii, 3-4.

Alvarez López, E.

1934. Los caracteres geográficos de la herpetofauna ibérica. *Bol. Soc. Esp. Hist. Nat.*, xxxiv, 6.

Baltzer, F.

1930. Ueber die Entwicklung des Tritonmerogons *Triton taeniatus* (♀) × *cristatus* ♂. *Rev. Suisse Zool.*, xxxvii, 12.

Banta, A. M.

1921. A convenient culture medium for daphnids. *Science (N. Y.), N. S.*, liii.

Bataillon, E.

1928. Études analytiques sur la maturation des oeufs des Batraciens. *C. r. Acad. Sci. Paris*, clxxxvii.

Bataillon, E.

1929. Études cytologiques et expérimentales sur les oeufs immatures de Batraciens. *Roux' Arch.*, cxvii.

Bataillon, E. et Tchou Su.

1930. Avortement de la gamétogenèse chez des hybrides d'Urodèles de deux ans. *C. r. Acad. Sci. Paris*, cxci.

Bataillon, E. et Tchou Su.

1932. Croisements en retour (2e géneration) entre une femelle hybride d'Urodèle et les mâles des deux types parentaux. *C. r. Acad. Sci. Paris*, cxcv.

Beaumont, J. de.

1933. La différenciation sexuelle dans l'appareil urogénital du *Triton* et son déterminisme. *Roux' Arch.* cxxix, 1,

Born, G.

1892. Die Reifung des Amphibieneies und die Befruchtung unreifer Eier bei *Triton taeniatus*. *Anat. Anz.*, vii.

Bytinski-Salz, H.

1933. Nomenklatorisches zur Benennung von Bastarden. *Internat. Entom. Ztschr. Guben,* XXVII, 14.

Cole, L. C., Painter, T. S. and Zeimet, A.

1928-29 a. Studies on pigeon hybrids I. Aberrant sex ratios. *Anat. Rec.,* XLI, abstr. 26.

Cole, L. C., Painter, T. S. and Zeimet, A.

1928-29 b. Studies on pigeon hybrids II. The chromosome conditions as an index of differential mortality of embryos. *Anat. Rec.,* XLI, abstr. 48.

Correns, C.

1924. Ein Fall experimenteller Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses *Ges. Abhdlgen.*

Du Bois, A. M. et Beaumont, J. de.

1927. Intersexualité phénotypique dans la gonade mâle de *Triton. C. r. Soc. Biol., Paris,* XCVII.

Dürken, B.

1929. Grundriss der Entwicklungsmechanik. Bornträger. Berlín

Fankhauser, G.

1930. Zytologische Untersuchungen an geschnürten *Triton* Eiern I. *Roux' Arch.,* CXXII.

Fankhauser, G.

1932. Cytological studies on egg fragments of the salamander *Triton* II. *J. exp. Zoöl.,* LXII.

Fankhauser, G.

1934 a. Cytological studies on egg fragments of the salamander *Triton* III. *J. exp. Zoöl.,* LXII, 2.

Fankhauser, G.

1934 b. Cytological studies on egg fragments of the salamander *Triton* IV. *J. exp. Zoöl.,* LXVII, 3.

Federley, H.

1929. Ueber subletale und disharmonische Chromosomenkombinationen. *Hereditas,* XII.

Federley, H.

1933-34. Gibt es eine Geschlechtsumwandlung als Folge einer Spezieskreuzung? *Hereditas,* xviii.

Franz, V.

1924. Geschichte der Organismen. Fischer, Jena.

Glaesner, L.

1925. Normentafel zur Entwicklungsgeschichte des gemeinen Wassermolchs *(Molge vulgaris).* En: *Normentafeln zur Entwicklungsgeschichte,* editado por Keibel; Fischer, Jena.

Glücksohn, S.

1932. Aeussere Entwicklung der Extremitäten und Stadieneinteilung der Larvenperiode von *Triton taeniatus* Ley d. und *cristatus* Laur. *Roux' Arch.,* cxxv, 2-3.

Goldschmidt, R.

1920. Mechanismus und Physiologie der Geschlechtsbestimmung. Bornträger Berlín.

Goldschmidt, R.

1931. Die sexuellen Zwischenstufen. Springer, Berlín.

Goldschmidt, R.

1934. Lymantria. *Bibliographia Genetica,* xi.

Goldschmidt, R. und Pariser, K.

1923. Triploide Intersexualität bei Schmetterlingen. *Biol. Zbl.* xliii, 4.

Haig Thomas, R. and Huxley, J. S.

1927. Sex-ratio in pheasant species crosses. *J. Genet.,* xiix.

Haldane, J. B. S.

1922. Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals *J. Genet.,* xii.

Hamburger, V.

1935. Malformations of hind limbs in species hybrids of *Triton taeniatus* (and *palmatus*) ♀ × *Triton cristatus* ♂. *J. exp. Zoöl.,* lxx, 1.

Hertwig, G. und P.

1914. Kreuzungsversuche an Knochenfischen. *Arch. mikrosk. Anat.,* lxxxiv.

Hertwig, O.

1882. Die Entwicklung des mittleren Keimblattes der Wirbeltiere. *Jenaer Z. Naturwschften,* xv.

Hertwig, O.

1893. Ueber den Wert der ersten Furchungszellen für die Organbildung des Embryo. Experimentelle Studien am Frosch- und Tritonei. *Arch. mikrosk. Anat.,* xlii.

Hertwig, P.

1920. Haploide und diploide Parthenogenese. *Biol. Zbl.,* xl.

Hertwig, R.

1921. Ueber den Einfluss der Ueberreife der Eier auf das Geschlechtsverhältnis von Fröschen und Schmetterlingen. *Sitzgsber. bayer. Akad. Wiss. Math-physik. Kl.*

King, H. D.

1911 a. Studies on sex-determination in Amphibians IV. *Biol. Bull.,* xx.

King, H. D.

1911 b. The sex-ratio in hybrid rats. *Biol. Bull.,* xxi.

Klatt, B.

1926. Fütterungsversuche an Tritonen I. *Roux' Arch.,* cvii.

Klatt, B.

1928. Fütterungsversuche an Tritonen II. *Roux' Arch.,* cix.

Kleinschmidt, A.

1934. Ein Beitrag zur stufenweisen zeitlichen Entwicklung des Urogenitalapparates des männlichen Teichmolches *(Triton vulgaris* L.) bis zur ersten Geschlechtsreife. *Jb. Morph. u. Anat. II. Abt.,* xxxvi, 3.

Kosswig, K.

1931. Die geschlechtliche Differenzierung bei den Bastarden von *Xiphophorus helleri* und *Platipoecilus maculatus* und deren Nachkommen. *Z. Abstammungslehre,* lvii.

Kosswig, K.

1932 a. Genotypische und phänotypische Geschlechtsbestimmung bei Zahnkarpfen und ihren Bastarden I. *Z. Abstammungslehre,* lxii.

Kosswig, K.

1932 b. Genotypische und phänotypische Geschlechtsbestimmung bei Zahnkarpfen III. *Roux' Arch.*, CXXVIII, 2.

Křiženecký, J.

1917. Ein Fall von Hermaphroditismus bei *Triton cristatus* und einige Bemerkungen zur Frage der sexuellen Differenzierung. *Arch. Entw. mechan.*, XLIV, 4.

Lantz, L. A.

1934. Molchbastarde. *Bl. Aquar.- u. Terrar. kde.*, XLV, 2.

Newman, H. H.

1914. Modes of inheritance in Teleost hybrids. *J. exp. Zoöl*, XVI.

Pariser, K.

1927. Die Zytologie und Morphologie der triploiden Intersexe des rückgekreuzten Bastards von *Saturnia pavonia* L. und *Saturnia pyri* Schiff. *Z. Zellforschg.*, V, 3.

Pariser, K.

1932. Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses bei künstlich erzeugten *Triton* bastarden. *Biol. Zbl.*, LII, 11-12.

Pariser, K.

1933. Nuevas investigaciones sobre la desviación de la relación numérica entre los sexos. *Investigación y Progreso*, VII, 7-8.

Pariser, K.

1935. Deformidades y otras anomalías en híbridos interespecíficos del género *Triton (Anfibios). Rev. Esp. Biol.*

Poll, H.

1909. Mischlinge von *Triton cristatus* Laur. und *Triton vulgaris* L. *Biol. Zbl.* XXIX, 1.

Spemann, H.

1901. Entwicklungsphysiologische Studien am *Tritonei. Arch. Entw. mechan.*, XII.

Spemann, H.

1918. Ueber die Determination der ersten Organanlagen des Amphibienembryo I-VI. *Arch. Entw. mechan.*, XLIII.

Steiner, H.

1926. Neuere Beobachtungen über *Triton Blasii* de l'Isle. Nochmalige erfolgreiche Kreuzung des *Triton marmoratus* mit *Triton cristatus* subspec. *carnifex. Bl. Aquar.- u. Terr. kde,* xxvii.

Witschi, E.

1922. Ueberreife der Eier als kausaler Faktor bei der Entstehung von Mehrfachbildungen und Teratomen. *Verh. Naturf. Ges. Basel,* xxxiv.

Witschi, E.

1923 a. Ueber die genetische Konstitution der Froschzwitter. *Biol. Zbl.* xliii, 1.

Witschi, E.

1923 b. Ergebnisse der neueren Arbeiten über die Geschlechtsprobleme bei Amphibien. *Z. Abstammungslehre,* xxxi, 3.

Witschi, E.

1929. Bestimmung und Vererbung des Geschlechts bei Tieren. *Handb. d. Vererbungswiss.* ii, d.

Wolterstorff, W.

1888. Unsere Kriechtiere und Lurche. *Z. ges. Naturwiss.,* lxi.

Wolterstorff, W.

1903. Ueber *Triton blasii* de l'Isle und den experimentellen Nachweis seiner Bastardnatur. *Zool. Jb.,* xix, 5.

Wolterstorff, W.

1910. Einiges über Molchbastarde. Weitere Mitteilungen über Polls Bastarde zwischen *Triton cristatus* ♂ und *Triton vulgaris* ♀. *Abhdlgen. u. Ber. a. d. Mus. f. Natur- u. Heimatkde Magdeburg,* ii, 1.

Wolterstorff, W.

1935. Katalog der Amphibien-Sammlung im Museum für Natur- und Heimatkunde zu Magdeburg. *Abhdlgen. u. Ber. a. d. Mus. f. Natur- u. Heimatkde Magdeburg,* iv, 2.

Fig. 1.

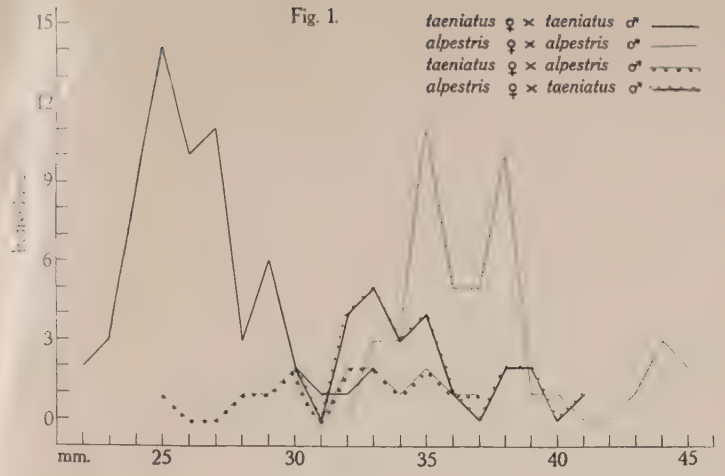


Fig. 2.

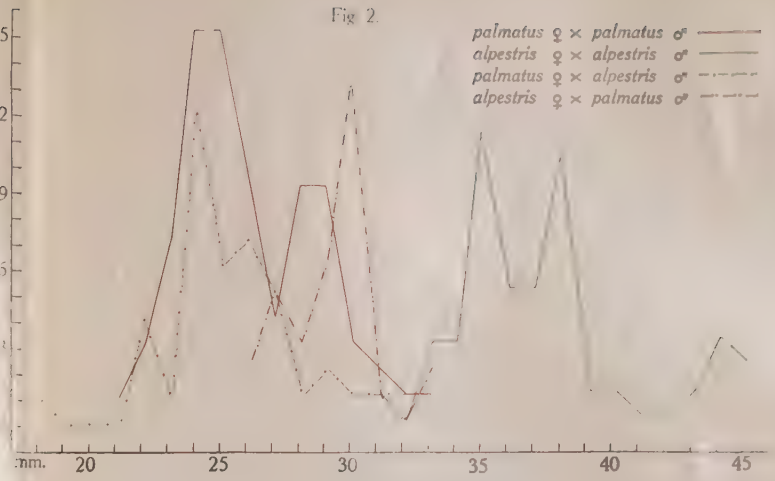
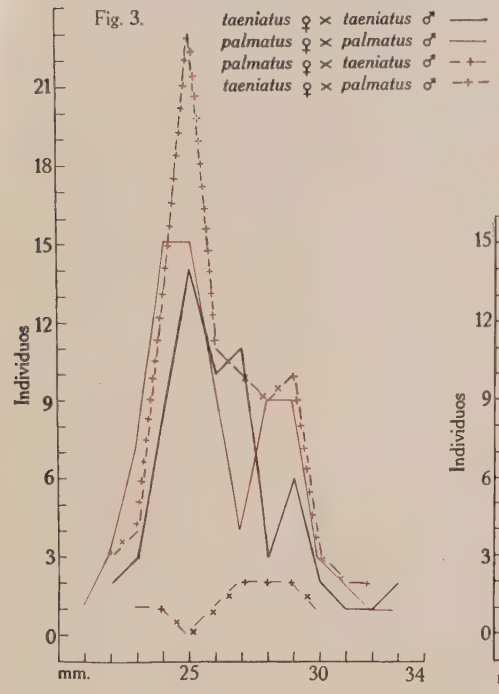
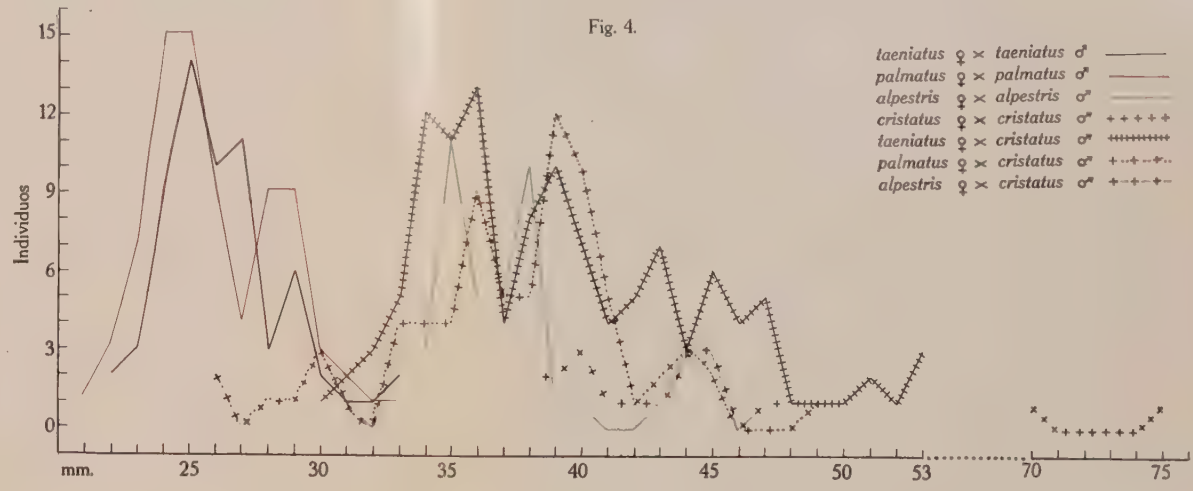


Fig. 3.



Tamaño alcanzado inmediatamente después de la metamorfosis por las combinaciones puras e híbridas de *Triton*.

Fig. 4.



UNA TÉCNICA RÁPIDA PARA TEÑIR FIBRAS ELÁSTICAS

POR

A. GALLEGO-GARCÍA

Nos proponemos con la presente nota dar a conocer los resultados favorables obtenidos con el empleo del azul de anilina como colorante selectivo de las fibras elásticas.

En técnica histológica se recurre corrientemente a dos procedimientos clásicos para la tinción de fibras elásticas: el de la orceína de Taenzer-Unna y el de la resorcina-fuchina de Weigert; el primero es aconsejado, especialmente en los manuales de técnica, como el más selectivo. Existen, además de éstos, numerosas variantes, entre las que debemos citar aquellas ideadas por autores españoles. En primer lugar, Gallego ha conseguido obtener bellas imágenes utilizando como colorante la fuchina básica y como mordiente el percloruro de hierro, llevando a cabo la técnica en diez a quince minutos. Recientemente, Carbonero ha publicado una modificación al método de Weigert, tiñendo en un solo tiempo con una mezcla de fuchina básica y percloruro de hierro y obteniendo, según se desprende de la lectura de su trabajo, resultados muy satisfactorios. Prescinde así del uso de la resorcina, que es lo característico del método de Weigert, con lo cual lo que en realidad propone este autor es una modificación al método de Gallego.

En todas las técnicas empleadas por los distintos autores para el fin que ahora nos ocupa, resalta la importancia del uso de mordientes y el deseo constante de abreviarlas en lo que respeta al tiempo total y al número de reactivos utilizados.

Consultando los manuales de técnica y hasta tratados tan completos como la enciclopedia de Krause, no hemos podido encontrar antecedente alguno sobre el empleo del azul de anilina como colorante selectivo de las fibras elásticas. Este hecho y las ventajas que creemos obtener con su empleo nos ha decidido a publicar esta nota.

Hemos utilizado el azul de anilina, soluble en agua, de Grübler, que se expende en el comercio con el nombre de «Anilinblau, wasserlöslich». La solución que nos ha suministrado mejor resultado es al 0,5 por 100; soluciones más concentradas restan selectividad a dicho colorante.

MARCHA DE LA TÉCNICA

1. Fijación en formol al 10 por 100. Cuando es muy prolongada, las coloraciones resultan mucho más débiles.
2. Cortes por congelación.
3. Coloración con solución acuosa el 0,5 por 100 de azul de anilina.

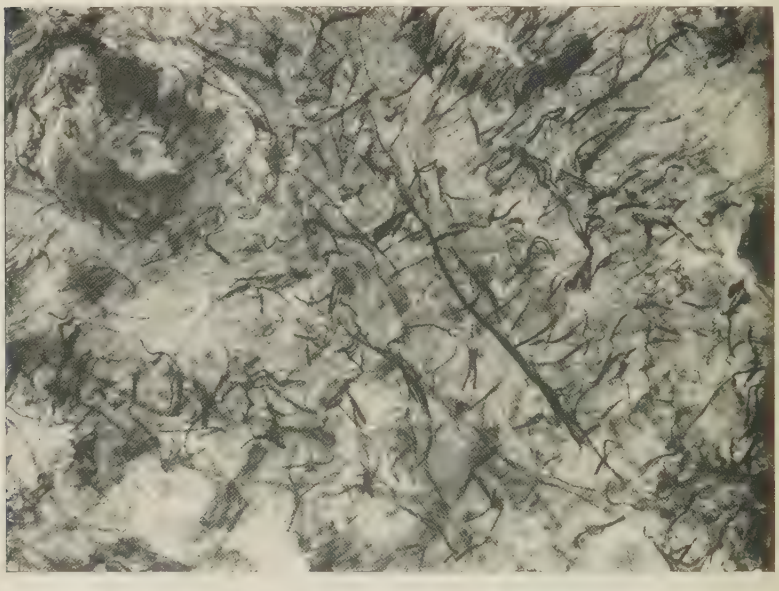


Fig. 1.

Calentar suavemente durante cinco minutos o mantener diez minutos en frío.

4. Lavado en agua.
5. Montaje en líquido de Apathy.

Resultado: Fibras elásticas en azul intenso. Núcleos y fibras colágenas en azul muy pálido.

Para dar un contraste, tiñendo las fibras colágenas, no es conveniente valerse ni del picro-índigocarmín ni de la picro-fuchina, pues las coloraciones resultan muy oscuras y sin selectividad. La misma fuchina ácida sin el ácido pícrico no se fija ni usándola antes ni después del azul de anilina. El empleo de la eosina nos ha dado, desde el principio, los me-

jores resultados. Es muy recomendable el uso simultáneo con el azul de anilina en una mezcla a partes iguales, procediendo de la siguiente forma:

1. Coloración con una mezcla a partes iguales de azul de anilina al 0,5 por 100 y eosina al 1 por 100. Durante cinco minutos en caliente o diez minutos en frío.
2. Lavado en agua.
3. Montaje en líquido de Apathy.

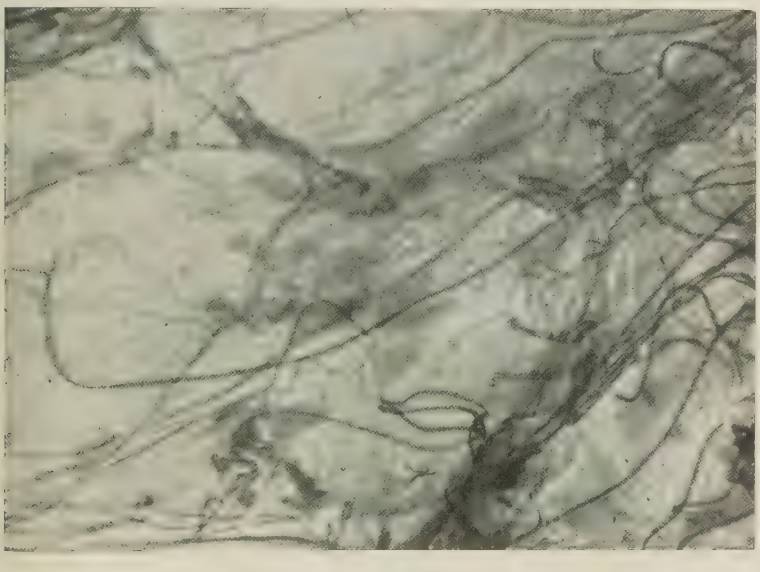


Fig. 2.

Resultado: Fibras elásticas en azul intenso; fibras colágenas en naranja; núcleos en azul muy pálido.

El montaje habitual, previa deshidratación y aclaramiento, decolora por completo las fibras elásticas. Nuestros ensayos efectuados con el fin de fijar el azul de anilina y permitir el uso ulterior del alcohol, han resultado hasta ahora infructuosos. Por tanto, aconsejamos el montaje en líquido de Apathy o en glicerina tal como se emplea en los casos de colorantes solubles en alcohol y, en especial, en la demostración de grasa.

Para obtener, en estas circunstancias, preparaciones permanentes se ha utilizado la goma arábiga, extendiendo una capa fina de la misma sobre el corte, dejándola secar y haciendo últimamente el montaje en bálsamo de Canadá. Utilizando de la misma forma el Apathy se obtienen

resultados semejantes; pero se tiene la ventaja de que puede acelerarse la desecación por el calor sin que se resquebraje y, además, de que la fusión del azúcar disuelto a mayor temperatura permite fijar de manera permanente el cubreobjetos sin tener que recurrir al bálsamo [1].

En cuanto a posibles combinaciones con coloraciones de núcleos, podemos aconsejar una coloración previa con el procedimiento de Gallego (fuchina acética-formol acético) o con hematoxilina; en ambos casos

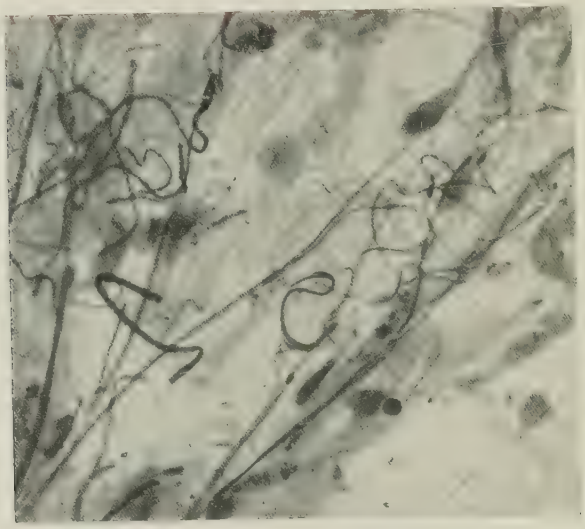


Fig. 3.

es más conveniente efectuar la coloración con azul de anilina en frío. Una coloración un poco prolongada con este colorante permite prescindir de otra coloración nuclear, ya que muestra a los núcleos con bastante precisión. No nos ha dado resultado la coloración nuclear previa con carbonato de plata.

Con estos datos proponemos las siguientes adaptaciones cuando queramos conseguir coloraciones completas:

[1] Recomendamos proceder del siguiente modo: 1, enjugar el corte con papel de filtro; 2, extender una capa fina de líquido de Apathy de una superficie por lo menos igual a la del cubreobjetos; 3, dejar secar en la estufa o a la tempetatura ambiente; 4, colocar el cubreobjetos, y 5, calentar hasta que el Apathy empiece a fundirse, presionando con la aguja para evitar la formación de burbujas de aire.

A) 1. Coloración con azul de anilina al 0,5 por 100. Durante diez minutos en caliente.

2. Lavado en agua.

3. Coloración complementaria con eosina.

4. Lavado en agua.

5. Montaje en líquido de Apathy.

Resultado: Fibras elásticas en azul intenso; fibras colágenas en najanja; núcleos en azul-violeta pálido.

B) 1. Coloración nuclear con fuchina acética-formol acético de Gallego o con hematoxilina.

2. Lavado en agua.

3. Coloración con azul de anilina al 0,5 por 100. Durante diez minutos en frío.

4. Lavado en agua.

5. Coloración complementaria con eosina.

6. Lavado rápido en agua.

7. Montaje en líquido de Apathy.

Resultado: Fibras elásticas en azul intenso; fibras colágenas en naranja; núcleos en rojo-violeta.

Résumé.

D'après la forme exposée dans ce travail, on peut utiliser le bleu d'aniline comme colorant sélectif des fibres élastiques, sans qu'il soit besoin de faire usage de mordants, en y laissant les coupes pendant cinq minutes. En outre, avec les adaptations proposées, il est facile d'obtenir en un peu plus de temps des images complètes des autres structures restantes, sans priver de leur sélectivité les fibres élastiques.

Les figures qui illustrent le travail correspondent à des images de fibres élastiques du derme, colorées avec le bleu d'aniline.

Laboratorio de Histopatología de la
Junta para Ampliación de Estudios.
Director: Dr. P. del Río-Hortega.

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE HISTORIA NATURAL

La Sociedad Española de Historia Natural se reune el primer miércoles, no festivo, de cada mes (exceptuando los de agosto y septiembre), en el Museo Nacional de Ciencias Naturales (Hipódromo), a las cinco y media de la tarde.

Organiza, además, conferencias pronunciadas por reconocidas autoridades científicas, después de la sesión ordinaria o en fecha que se indica de antemano.

Igualmente organiza sesiones de *Cine científico* en locales apropiados, cuya entrada es por invitación.

Sus publicaciones son:

1.° El Boletín de la Sociedad Española de Historia Natural; consta de 10 números al año, con abundantes láminas y figuras intercaladas. Cada número contiene el acta de la sesión del mes correspondiente, comunicaciones cortas, trabajos de investigación presentados por los señores socios y una sección bibliográfica en la que se reseñan las obras de asuntos de Ciencias Naturales que se publican sobre la Península Ibérica y las de carácter general.

2.° Las Memorias de la Sociedad Española de Historia Natural; cuadernos sueltos y de publicación no periódica, comprendiendo cada uno un solo y extenso trabajo con láminas y figuras.

3.° Las Reseñas Científicas. En esta Revista se reunen todas las conferencias organizadas por esta Sociedad, acompañadas de artículos de conjunto sobre asuntos de Ciencias Naturales y Ciencias afines, y de una sección informativa sobre investigaciones nuevas o libros de interés para el naturalista.

4.° La Revista Española de Biología, en la que se publican trabajos científicos originales sobre temas biológicos. Esta nueva publicación de la Sociedad constituye una continuación del «Boletín de la Sociedad Española de Biología» y aparece en cuadernos trimestrales para constituir un tomo anual de unas 250 páginas de texto, con abundantes láminas y figuras intercaladas.

	Pesetas
Los *socios numerarios* que reciben todas las publicaciones, pagando los residentes en España una cuota anual de	20
Los *socios numerarios* extranjeros pagan	22,50
Los *socios agregados* no reciben más que el Boletín, y pagan anualmente.	15
Los *socios vitalicios* reciben todas las publicaciones y, además, a su ingreso en la Sociedad, 10 volúmenes elegidos entre aquellos de que haya existencias (excepto los tomos I, V, VI y VII de los Anales y XIV del Boletín). La cuota, que puede pagarse en dos fracciones anuales y consecutivas, es de	250

Los socios pueden adquirir con una rebaja del 30 por 100, por intermedio de la Secretaría, las publicaciones de la Junta para Ampliación de Estudios e Investigaciones científicas, y con otra bonificación las de la Editorial Labor.

La Biblioteca, ya muy numerosa, está abierta a los socios todos los días laborables, de nueve a una de la mañana.

Las personas que deseen pertenecer a la Sociedad habrán de ser presentadas por tres de los socios, pudiendo también acudir directamente a la Secretaría.

Para otros detalles, dirigirse al Sr. Secretario, y para las cuestiones económicas al Sr. Tesorero de la Sociedad Española de Historia Natural, Museo Nacional de Ciencias Naturales, Hipódromo, Madrid. Las cuotas pueden también ingresarse, para mayor facilidad, en la cuenta corriente de la Sociedad, en el Banco Hispano Americano.

SUMARIO

Páginas.

M. Prados y Such: La vitamina «C» en la técnica histológica del sistema nervioso 5

Käte Pariser: El desarrollo y la relación numérica entre los sexos en los híbridos interespecíficos obtenidos por fecundación artificial en el género *Triton (Molge)*..... 11

A. Gallego-García: Una técnica rápida para teñir fibras elásticas..... 95